



ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE CHIMICE
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ
“PETRU PONI”
Domeniul CHIMIE

*Arhitecturi polimerice hibride
concepute ca structuri hidrogel
Rezumatul tezei de doctorat*

Conducător de doctorat:
DR. LOREDANA E. NIȚĂ

Student-doctorand:
ISABELLA COBZARIU
(căs. NACU)

ACADEMIA ROMÂNĂ
Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

.....

Vă aducem la cunoștință faptul că în ziua de **30 septembrie 2024**, ora **14:00**, în Sala de Conferințe a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat **„Arhitecturi hibride concepute ca structuri hidrogel”**, autor **Isabella Cobzariu (căs. Nacu)** în vederea acordării titlului științific de doctor.

PREȘEDINTE: CS I Dr. Anton Airinei

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

CONDUCĂTOR

ȘTIINȚIFIC: CS I Dr. Habil. Loredana Elena Niță

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

REFERENȚI: Profesor Dr. Liliana Vereștiuc

Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa”, Iași

Conferențiar Dr. Robert Vasile Grădinaru

Universitatea „Alexandru Ioan Cuza, Iași

CS I Dr. Gheorghe Fundueanu-Constantin

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea doctoratului pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica aprecierile și observațiile dumneavoastră.

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

Mulțumiri

Obținerea titlului de doctor este un pas important în dezvoltarea mea profesională, așa că aș dori să-mi exprim recunoștința tuturor celor care au contribuit și au inspirat prezenta lucrare.

Deosebită recunoștință doamnei **Dr. Loredana Elena Niță**, îndrumătorul științific al tezei de doctorat, pentru sprijinul continuu, dedicarea și profesionalismul pe care mi l-a oferit pe întreg parcursul procesului de elaborare al lucrării de doctorat.

Mulțumesc referenților științifici, **Prof. Dr. Liliana Vereștiuc**, **Dr. Gheorghe Fundueanu-Constantin** și **Conf. Dr. Robert Vasile Grădinaru**, pentru disponibilitatea, timpul și răbdarea acordate evaluării acestei teze.

Alese mulțumiri pentru sprijinul și îndrumările oferite de către doamna **Dr. Aurica Chiriac** pentru sugestiile și sfaturile acordate în realizarea unor studii de cercetare.

Adresez mulțumiri și aleasă recunoștință membrilor comisiei de îndrumare, **Dr. Maria Bercea** și **Dr. Alina Ghilan** pentru răbdare, cunoștințele împărtășite și sfaturile oferite în perioada stagiului doctoral.

Distinse mulțumiri se îndreaptă către colectivul Centrului de inginerie tisulară și medicină regenerativă, din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” și anume doamnei **Prof. Dr. Liliana Vereștiuc** pentru sprijinul continuu oferit pentru dezvoltarea mea profesională precum și pentru îndrumarea în realizarea studiilor referitoare la obținerea suporturilor polimerice prin tehnica de imprimare și bioimprimare 3D, doamnei **Conf. Dr. Vera Bălan** pentru permisiunea utilizării suspensiei de nanoparticule magnetice sintetizate de dumneaei pentru obținerea de suporturi cu aplicații în ingineria țesutului osos. De asemenea, adresez recunoștință și mulțumiri doamnei **Conf. Dr. Maria Butnaru** pentru îndrumarea oferită în realizarea testelor de citocompatibilitate. Sincere mulțumiri adresez doamnei **Asist. Dr. Florina Daniela Cojocaru** și doamnei **Asist. Dr. Andreea Luca** pentru susținerea nemărginită, încurajările mereu binevenite pe parcursul stagiului meu doctoral.

Deosebite mulțumiri colegilor din colectiv, în **special Dr. Alina Gabriela Rusu**, **Dr. Alexandra Vieru** pentru timpul și sprijinul acordat în fiecare etapă a acestui demers științific.

Cu recunoștință, adresez distinse mulțumiri colegilor din Institutul de Chimie Macromoleculară “Petru Poni” pentru sugestii și colaborare pentru realizarea acestei teze de doctorat.

Mulțumesc **Academiei Române** pentru suportul financiar acordat pe parcursul stagiului de pregătire a tezei de doctorat.

Cu recunoștință, aș dori să îmi exprim profundele mulțumiri **părinților mei** pentru sprijinul necondiționat oferit.

Nu în ultimul rând, doresc să îi mulțumesc soțului meu, **Flavius**, pentru răbdare nemărginită, încredere și susținere necontetită.

Vă mulțumesc!

Cuprins

INTRODUCERE	8
I. STUDIU DE LITERATURĂ	
CAPITOLUL I. MATRICE POLIMERICE CU APLICAȚII BIOMEDICALE – HIDROGELURI HIBRIDE –.....	
I.1. Clasificarea hidrogelurilor.....	
I.1.1. Aspecte generale referitoare la hidrogelurile hibride.....	
I.1.2. Polimeri utilizați pentru obținerea de hidrogeluri hibride.....	
I.1.3. Polimeri sintetici.....	
I.1.4. Metode de preparare a hidrogelurilor.....	
I.1.5. Proprietăți fizico-chimice ale hidrogelurilor.....	
I.2. Metode de formare a arhitecturilor complexe prin (bio)imprimare.....	
I.2.1. Definiția conceptului de (bio)imprimare.....	
I.2.2. Metode de (bio)imprimare.....	
I.2.3. Proprietățile (bio)cernelurilor utilizate în tehnologia de imprimare 3D.....	
I.2.4. Aplicații biomedicale ale rețelelor polimerice hibride.....	
I.2.4.1. Hidrogeluri hibride pentru ingineria tisulară.....	
I.2.4.2. Obținerea de arhitecturi biohibride.....	
I.2.4.3. Încorporarea de nano/microstructuri în hidrogeluri hibride.....	
I.3. Concluzii.....	
CONTRIBUȚII PROPRII	
CAPITOLUL II. REACȚII DE FUNCȚIONALIZARE ALE POLIMERILOR NATURALI	
II.1. Reacția de funcționalizare a proteinelor.....	10
II.1.1. Protocolul de funcționalizare a gelatinei cu anhidridă metacrilică.....	10
II.2. Reacția de funcționalizare a polizaharidelor.....	
II.2.1. Reacția de modificare a chitosanului.....	
II.2.2. Reacția de funcționalizare a alginatului de sodiu, a gumei xantan și a dextranului.....	
II.2.3. Reacția de modificare a acidului hialuronic.....	
II.3. Caracterizarea structurală a polimerilor naturali funcționalizați cu grupări polimerizabile.....	
II.3.1. Rezonanță magnetică nucleară (RMN).....	
II.3.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).....	
II.3.3. Determinarea gradului de substituție prin metode colorimetrice.....	
II.4. Analiză termogravimetrică (TG/DTG).....	
II.4.1. Gelatina metacrilată.....	
II.4.2. Chitosan metacrilat.....	
II.4.3. Alginat de sodiu metacrilat.....	
II.4.4. Guma xantan metacrilată.....	
II.5. Testarea proprietăților biologice.....	
II.5.1. Testarea citocompatibilității prin metoda MTT.....	
II.5.2. Morfologie celulară.....	
II.6. Concluzii.....	
CAPITOLUL III. HIDROGELURI HIBRIDE PENTRU TRATAMENTUL LEZIUNILOR CUTANATE	
III.1. Metoda de obținere a hidrogelurilor hibride pe bază de polimeri cu grupări polimerizabile.....	
III.1.1. Caracterizarea hidrogelurilor.....	
III.1.2. Încărcarea hidrogelurilor hibride cu doxorubicină.....	
III.1.3. Concluzii.....	
III.2. Hidrogeluri hibride pe bază de acid hialuronic și o structură poliestică alifatică.....	15
III.2.1. Metoda de obținere a gelurilor pe bază de PEBSA și acid hialuronic.....	15
III.2.2. Caracterizarea hidrogelurilor hibride.....	
III.3. Aplicații biomedicale ale hidrogelurilor hibride pe bază de structuri poliesterice alifatică și polizaharide.....	
III.3.1. Obținerea de sisteme bioactive care prezintă caracter antioxidant.....	17
III.3.2. Caracterizarea complexului copolimer/principiu bioactiv.....	
III.3.3. Prepararea gelurilor bioactive.....	
III.4. Concluzii.....	
CAPITOLUL IV. ARHITECTURI HIBRIDE PE BAZĂ DE GELATINĂ METACRILATĂ ȘI PEGDA REALIZATE PRIN TEHNICA IMPRIMĂRII 3D PENTRU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ	

<hr/>	
IV.1. Suporturi imprimate 3D pe bază de gelatină metacrilată și PEGDA.....	
IV.1.1 Obținerea cernelurilor pe bază de GelMA și PEGDA	
IV.1.2. Proprietățile reologice ale gelurilor.....	
IV.1.3. Obținerea matricelor prin imprimare 3D.....	
IV.1.4. Caracterizarea suporturilor imprimate.....	
IV.1.5. Citocompatibilitatea suporturilor imprimate 3D	
IV.1.6. Proprietăți bioadezive.....	
IV.1.7. Hemocompatibilitatea	
IV.1.8. Concluzii	
IV.2. Suporturi hibride imprimate pe bază de acid hialuronic și PEBSA	20
IV.2.1. Metoda de obținere a cernelurilor.....	20
IV.2.2. Testarea proprietăților reologice.....	
IV.2.3. Imprimarea 3D a cernelurilor	
IV.2.4. Caracterizarea suporturilor 3D	
IV.2.5. Încărcarea matricelor cu principiu activ	
IV.2.6. Evaluarea citotoxicității <i>in vitro</i>	20
IV.2.7. Concluzii	
CAPITOLUL V. OBȚINEREA PRIN IMPRIMARE 3D A SUPTURILOR HIBRIDE PE BAZĂ DE ACID HIALURONIC MODIFICAT CU METACRILAT DE GLICIDIL ȘI PEBSA	21
V.1. Metoda de obținere a suporturilor hibride.....	22
V.1.1. Caracterizarea structurilor imprimate 3D	
V.1.1.1. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)	
V.1.1.2. Microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	22
V.1.2. Gradul de retenție al fluidelor simulate	
V.1.3 Încărcarea matricelor cu principii active	22
V.1.4. Teste de citocompatibilitate	23
V.1.5. Teste <i>in vivo</i>	
V.1.6. Concluzii.....	
CAPITOLUL VI. SUPORTURI PE BAZĂ DE GELATINĂ ȘI CHITOSAN METACRILAT, ACID HIALURONIC, NANOPARTICULE MAGNETICE, OBȚINUTE PRIN IMPRIMARE 3D, PENTRU INGINERIA TISULARĂ A ȚESUTULUI OSOS	23
VI.1. Prepararea cernelurilor compozite și caracterizarea lor.....	24
VI.1.1. Caracterizarea reologică a cernelurilor compozite	24
VI.1.2. Printabilitatea cernelurilor compozite și obținerea suporturilor 3D	
VI.2. Caracterizarea suporturilor imprimate.....	
VI.2.1. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR).....	
VI.2.2. Difracție de raze X	
VI.3. Morfologia suporturilor (SEM)	25
VI.4. Gradul de umflare și cinetica de degradare a suporturilor imprimate	25
VI.5. Proprietățile mecanice și magnetice ale suporturilor.....	
VI.6. Citocompatibilitatea <i>in vitro</i>	
VI.6.1. Testul MTT	
VI.6.2. Testele de morfologie celulară	
VI.7. Concluzii	
CAPITOLUL VII. ARHITECTURI BIOHIBRIDE PE BAZĂ DE POLIMERI FUNCȚIONALIZAȚI OBȚINUTE PRIN TEHNICA (BIO)IMPRIMĂRII 3D	26
VII.1. Prepararea cernelurilor pentru obținerea suporturilor hibride	
VII.1.1. Măsurători reologice	27
VII.1.2. Obținerea suporturilor prin imprimare 3D	
VII.1.3. Caracterizarea suporturilor obținute prin imprimare 3D.....	
VII.1.3.1. Analiză structurală (FT-IR).....	
VII.1.4. Morfologia suporturilor.....	
VII.1.5. Gradul de retenție al fluidelor simulate.....	
VII.1.6. Teste de degradare enzimatică	
VII.1.7. Teste de bioadeziune <i>in vitro</i>	
VII.1.8. Teste mecanice.....	
VII.1.9. Interacțiunea suporturilor cu mediul celular	
VII.1.10. Concluzii.....	

VII.2. Arhitecturi biohibride realizate prin tehnica imprimării 3D cu aplicații în regenerarea leziunilor cutanate	28
VII.2.1. Metoda de obținere a suporturilor imprimate	
VII.2.1.1. Prepararea cernelurilor pe bază de polimeri cu grupări polimerizabile	
VII.2.1.2. Obținerea suporturilor prin imprimare 3D	
VII.2.2. Caracterizarea chimică a materialelor imprimate	
VII.2.3. Microscopie electronică de baleiaj (SEM)	
VII.2.4. Gradul de retenție al fluidelor simulate	
VII.2.5. Degradarea enzimatică a suporturilor imprimate	
VII.2.6. Testarea interacțiunii suporturilor cu mediul celular	
VII.2.7. Popularea suporturilor cu celule	
VII.2.8. Teste de migrare celulară (Wound healing)	
VII.3. Obținerea de suporturi biohibride bistratificate prin bioimprimare 3D	28
VII.3.1 Obținerea de arhitecturi biohibride bistratificate	29
VII.3.2. Evaluarea materialelor biohibride. Determinarea IL-6 prin testul Elisa	
VII.3.3. Teste <i>in vivo</i>	29
VII.3.3.1. Timpul de vindecare	
VII.3.3.2. Gradul de reducere al suprafeței plăgilor	
VII.3.4. Evaluări histologice	
VII.3.4.1. Imunohistochimie	
VII.3.4.2. Expresia tipurilor de colagen I, III și IV	
VII.4. Concluzii	
CAPITOLUL VIII. MATERIALE ȘI METODE DE CARACTERIZARE	
VIII.1. Materiale utilizate pentru prepararea suporturilor	
VIII.1.2. Materiale utilizate pentru modificarea polimerilor naturali	
VIII.1.3. Materiale utilizate pentru caracterizarea suporturilor	
VIII.1.4. Materialele necesare pentru studiile <i>in vitro</i> de degradare enzimatică	
VIII.1.5. Materialele necesare pentru studiile de încărcare cu principii active ale matricelor polimerice	
VIII.1.6. Materialele necesare pentru studiile referitoare la cuantificarea capacității antioxidante a hidrogelurilor încărcate cu principiu activ	
VIII.1.7. Materialele utilizate în testele de citotoxicitate <i>in vitro</i>	
VIII.1.8. Teste de citotoxicitate <i>in vivo</i>	
VIII.2. METODE DE CARACTERIZARE	
VIII.2.1. Caracterizarea polimerilor funcționalizați	
VIII.2.1.1. Spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară	
VIII.2.1.2. Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)	
VIII.2.2. Metode colorimetrice de cuantificare a gradului de modificare	
VIII.2.2.1. Metoda cu TNBS	
VIII.2.2.2. Metoda cu reactiv ninhidrină	
VIII.2.2.3. Metoda cu reactiv KMnO ₄	
VIII.2.3. Caracterizarea gelurilor prin teste reologice	
VIII.2.4. Caracterizarea nanoparticulelor	
VIII.2.4.1. Tehnica de împrăștiere dinamică a luminii (DLS)	
VIII.2.5. Caracterizarea hidrogelurilor și suporturilor	
VIII.2.5.1. Analiza termică	
VIII.2.5.2. Difracție cu raze X (XRD)	
VIII.2.6. Analize de microscopie	
VIII.2.6.1. Microscopie electronică de baleiaj (SEM)	
VIII.2.6.2. Microscopie stereomicroscopică	
VIII.2.7. Proprietățile mecanice ale suporturilor	
VIII.2.8. Proprietățile bioadezive ale suporturilor	
VIII.2.9. Proprietățile magnetice ale suporturilor	
VIII.2.10. Grad de retenție al fluidelor simulate	
VIII.2.11. Spectroscopia de absorbție în UV-VIS	
VIII.2.11.1. Studii de degradare enzimatică <i>in vitro</i>	
VIII.2.11.1.1. Determinarea concentrației de chitosan degradat	
VIII.2.11.1.2. Determinarea concentrației de colagen degradat	
VIII.2.11.2. Eliberarea moleculelor bioactive din matricele polimerice	
VIII.2.11.3. Activitatea antioxidantă a structurilor bioactive	
VIII.2.12. Testul de citocompatibilitate <i>in vitro</i>	

VIII.2.12.1. Testul prin metoda MTT.....
VIII.2.12.2. Teste de morfologie celulară.....
VIII.2.13. Teste de migrare celulară (Wound healing).....
VIII.2.14. Popularea matricelor polimerice cu celule.....
VIII.2.15. Determinarea citokinelor.....
VIII.2.16. Teste de biocompatibilitate <i>in vivo</i>
VIII.2.16.1. Histologie.....
VIII.2.16.2. Imunohistochimie.....
VIII.2.17. Testarea biocompatibilității <i>in vivo</i> și analize hematologice.....
CAPITOLUL IX.CONCLUZII GENERALE ȘI PERSPECTIVE.....
Referințe bibliografice.....

INTRODUCERE

În urmă cu 31 de ani Joseph P. Vacanti [1] definea ingineria tisulară ca fiind un domeniu ce „aplică principii ale biologiei, alături de cele ale ingineriei, în scopul dezvoltării unor înlocuitori funcționali pentru refacerea țesutului lezat”. Mai târziu, William Haseltine [2] a propus termenul de „medicină regenerativă” pentru a descrie un domeniu interdisciplinar care îmbină cunoștințele provenite din diferite arii de cercetare (inginerie, biologie celulară, biomecanică, nanotehnologie și biochimie) și care permite proiectarea unor suporturi pentru înlocuirea/regenerarea de țesuturi/organe lezate, în vederea restabilirii funcțiilor fiziologice caracteristice.

În ultimii ani cele două domenii s-au întrepătruns generând un domeniu complex ce poartă denumirea de *inginerie tisulară și medicină regenerativă* (TERM) [3]. Scopul principal al acestui domeniu este de a cerceta și realiza suporturi cu structură 3D complexă pentru înlocuirea sau regenerarea țesutului/organelor lezate.

Printre sistemele complexe utilizate în ingineria tisulară se numără și structurile poroase cu morfologie 3D, denumite hidrogeluri. Aplicarea lor în ingineria tisulară necesită prezența unor proprietăți precum, biocompatibilitate, biodegradabilitate și stabilitate mecanică. În acest sens, s-a urmărit dezvoltarea unor hidrogeluri hibride, prin combinarea polimerilor naturali cu structuri sintetice, și care să-și demonstreze capacitatea de a imita matricea extracelulară (ECM) [4–6].

Pornind de la aceste aspecte obiectivul tezei de doctorat intitulată “**Arhitecturi polimerice hibride concepute ca structuri hidrogel**” constă în proiectarea, obținerea și optimizarea unor noi sisteme pe bază de biopolimeri, biopolimeri funcționalizați și polimeri sintetici, cu structură, proprietăți fizico-chimice și biologice adecvate, care să prezinte potențial aplicativ în medicina regenerativă.

Motivația direcției de cercetare abordată în cadrul tezei de doctorat are la bază importanța obținerii de hidrogeluri hibride/biohidride prin tehnica de imprimare 3D. Noutatea studiilor a constat în utilizarea unor polimeri funcționalizați cu grupări polimerizabile, metacriloi, pentru crearea de structuri complexe prin tehnici inovatoare de imprimare 3D. Teza este structurată în două părți și cuprinde nouă capitole, cu anexe și referințe.

Partea I a tezei de doctorat cuprinde un capitol de noțiuni introductive divizat în două subcapitole. Subcapitolul I este dedicat studiului de literatură referitor la proiectarea hidrogelurilor hibride, iar cel de-al doilea se referă la stadiul actual al cunoașterii științifice din domeniul obținerii de hidrogeluri hibride prin tehnica de imprimare 3D.

Partea a II-a a tezei de doctorat este structurată în șase capitole și prezintă contribuțiile originale privind obținerea, caracterizarea structurală și fizico-chimică, dar și testarea *in vitro/in vivo* a hidrogelurilor hibride realizate.

Capitolul II cuprinde studiul privind realizarea unor transformări polimer analoage a unor biopolimeri: a unei proteine (gelatina) și a cinci polizaharide (chitosan, alginat de sodiu, gumă xantan, dextran și acid hialuronic), capabile să formeze rețele 3D prin procese de reticulare/autoreticulare, și care să prezinte aplicabilitate biomedicală.

Capitolul III include prepararea și caracterizarea fizico-chimică a unor hidrogeluri hibride și utilizarea lor ca sisteme de administrare topică a unor principii active, în aplicații de inginerie tisulară a țesutului epitelial: (i) hidrogeluri pe bază de polimeri funcționalizați cu anhidridă metacrilică (chitosan, dextran, xantan și gelatină) și acrilamidă, AAm și N,N'-metilenbis(acrilamidă), BisAAm, cu aplicații în terapia cancerului și (ii) geluri multicomponente hibride ce au la bază o copolimarolactonă sintetică (copolimerul poli(brasilat de etilenă-co-acid scuaric, PEBSA) și acid hialuronic (HA), cu proprietăți antioxidante, datorită înglobării și eliberării controlate a quercetinei.

Capitolul IV prezintă prepararea și caracterizarea a două noi tipuri de hidrogeluri hibride realizate prin tehnica de imprimare 3D: (i) hidrogeluri pe bază de gelatina metacrilată (GelMA), cu diferite grade de funcționalizare și poli (etilen glicol) diacrilat (PEGDA) și respectiv (ii) pe bază de PEBSA și HA, obținute în Capitolul III, cu proprietăți reologice îmbunătățite adecvate imprimării 3D prin adăugarea de GelMA.

Gelurile hibride au fost supuse unor analize reologice iar hidrogelurile obținute după formare au fost testate din punctul de vedere al structurii, morfologiei, biocompatibilității *in vitro*. De asemenea, a fost evaluat profilul de eliberare al principiilor active încapsulate pentru demonstrarea aplicabilității lor ca plasturi transdermici.

Capitolul V descrie prepararea de cerneluri hibride cu proprietăți imprimabile, realizate din copolimacrolactona PEBSA și acidul hialuronic modificat cu metacrilat de glicidil (GMA), cât și posibilitatea de încapsulare în cerneluri a două principii active: eritromicina și ibuprofen. Hidrogelurile cu proprietăți multifuncționale obținute au fost caracterizate structural, morfologic, dar și din punct de vedere al biocompatibilității (*in vitro* și *in vivo*) și a capacității de eliberare de principii active, în vederea demonstrării aplicabilității lor, în principal ca plasturi cu acțiune antibacteriană și antiinflamatoare.

Capitolul VI cuprinde informații referitoare la obținerea unor matrice compozite pe bază de: GelMA, două tipuri de chitosan metacrilat (LCsMA, HCsMA), acid hialuronic, hidroxiapatită (HAp) și suspensie coloidală de nanoparticule magnetice (MNP). În cadrul studiului s-a urmărit influența masei moleculare a chitosanului și a cantității de HAp asupra imprimabilității, morfologiei, proprietăților fizico-chimice și biologice ale matricelor destinate aplicațiilor ingineriei tisulare a țesutului osos.

Capitolul VII prezintă obținerea unor arhitecturi biohibride. Prima parte a studiului prezintă analiza influenței naturii și masei moleculare a gelatinei asupra dezvoltării unor cerneluri și suporturi biohibride cu proprietăți inovatoare, pe bază de amestecuri între GelMA (A și B), XGMA și HA, realizate prin tehnica imprimării 3D utilizând metoda extrudării. Cel de-al doilea obiectiv al studiului a avut în vedere realizarea unor bioarhitecturi cu structură bistratificată, prin suprapunerea peste o bază de celuloză populată cu keratinocite a unui suport pe bază de GelMA și AlgMA, anterior populat cu fibroblaste normale umane. Alături de proprietățile fizico-chimice s-a urmărit activitatea imunologică prin test ELISA, după care matricele bistratificate au fost aplicate pe suprafața unor plăgi realizate pe un animal model (șoarece) pentru a dovedi efectul acestora asupra factorilor esențiali în procesul de vindecare.

Capitolul VIII cuprinde informații generale despre materialele utilizate în studiile experimentale, privind obținerea fiecărui tip de hidrogel, dar și echipamentele folosite la caracterizarea compușilor obținuți.

Ultimul capitol al tezei, **Capitolul IX**, cuprinde concluziile generale extrase în urma evaluării rezultatelor experimentale, precum și perspectivele de dezvoltare în domeniul imprimării 3D.

Teza de doctorat intitulată „**Arhitecturi hibride concepute ca structuri hidrogel**” cuprinde 266 de pagini împărțite în 9 capitole, ce includ 39 de tabele, 182 figuri și 454 referințe bibliografice. Rezultatele originale constituie subiectul a 4 lucrări cotate ISI (FI cumulat: 22,3), a unui articol aflat în evaluare, a 9 comunicări orale și 3 postere prezentate în cadrul unor conferințe internaționale. Doctoranda a participat pe parcursul stagiului doctoral și la activități de cercetare conexe care au făcut obiectul a 6 articole științifice publicate în reviste ISI (factor cumulat: 28,4).

Contribuții personale originale

Capitolul II. Reacții de funcționalizare ale polimerilor naturali

Multitudinea de avantaje pe care le prezintă biopolimerii (polizaharidele și proteinele), precum biocompatibilitate, biodegradabilitate biomimetism și bioactivitate, comparativ cu polimerii sintetici, recomandă utilizarea lor în obținerea de suporturi cu aplicații în medicina regenerativă [7,8]. Cu toate acestea, există o serie de inconveniente legate de metodele de procesare ale polimerilor naturali, precum solubilitatea scăzută, sensibilitatea la temperatură sau rezistența mecanică redusă. Soluția la aceste neajunsuri este reprezentată de grefarea unor grupări noi pe structura polimerică care să le ofere acestora o serie de caracteristici suplimentare [9]. Astfel, polimerii rezultați pot fi utilizați pentru obținerea unor arhitecturi 3D cu diverse posibilități de aplicație, în funcție de compoziție, metoda de procesare sau de metoda de reticulare [10].

Scopul studiului a fost de a obține polimeri funcționalizați cu grupări metacrilice, prin intermediul unor transformări polimer-analoage cu anhidridă metacrilică sau metacrilat de glicidil, rezultând derivați polimerici capabili să formeze rețele tridimensionale, prin procese de reticulare/autoretilulare, utilizabile ca suporturi în aplicații biomedicale. Pentru realizarea acestora, s-au propus următoarele obiective specifice:

Obiectivul 1. Funcționalizarea gelatinei prin reacții de metacrilare selectivă a biopolimerului cu anhidrida metacrilică.

Obiectivul 2. Funcționalizarea chitosanului: obținerea unui derivat de chitosan solubil la pH fiziologic, neutru, cu grupări C=C, prin reacția de substituție nucleofilă cu anhidrida metacrilică.

Obiectivul 3. Funcționalizarea alginatului de sodiu, gumei xantan și dextran prin reacții de funcționalizare selectivă ale polizaharidelor cu anhidrida metacrilică.

Obiectivul 4. Funcționalizarea acidului hialuronic: obținerea unui derivat cu grupări C=C prin reacții de funcționalizare, utilizând metoda deschiderii inelului epoxidic al monomerului metacrilat de glicidil.

II.1. Reacția de funcționalizare a proteinelor

II.1.1. Protocolul de funcționalizare a gelatinei cu anhidridă metacrilică

În cadrul acestui studiu au fost modificate catenele polimerice a două tipuri distincte de gelatină: Gelatina A (de origine porcină, vâscozitatea gelului ~175 g Bloom) și Gelatina B (de origine bovină, vâscozitatea gelului ~225g Bloom), prin utilizarea protocolului descris de Camci-Unal și colaboratorii săi [11], cu o serie de modificări ale metodei inițiale. La soluțiile omogene de gelatină obținute în PBS (pH 7,2, 0,01M), aduse la temperatura de 50°C, s-au adăugat câte 8mL de anhidridă metacrilică (MA, 94%), cu un debit de 0,5 mL/min, în condiții de agitare continuă și temperatură constantă (300rpm, 50°C).

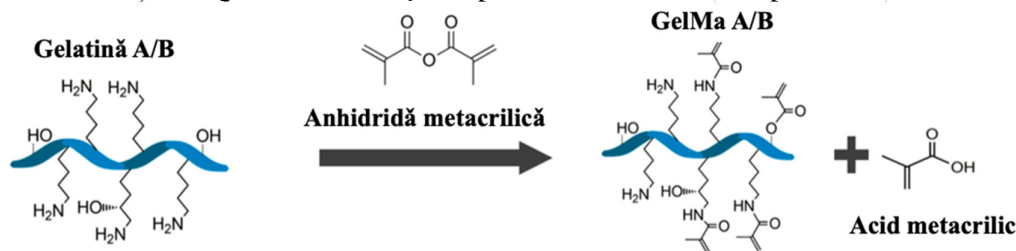


Figura 1. Reacția de modificare a gelatinei cu anhidrida metacrilică [12,13].

Pentru gelatina de tip A s-a studiat influența timpului de reacție asupra gradului de funcționalizare, motiv pentru care s-au realizat modificări chimice la intervale de timp diferite: 2, 4, 6 și 8 ore. Reacția gelatinei B cu anhidrida metacrilică s-a realizat pentru un

singur interval de timp, de 6 ore. Structura chimică a polimerilor modificați a fost confirmată prin spectroscopie ^1H RMN, iar analizele colorimetrice au permis determinarea gradului de substituție a produșilor de reacție.

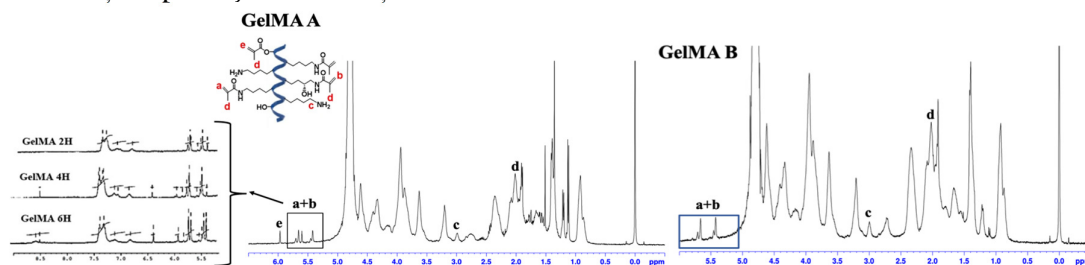


Figura 2. Spectrul ^1H RMN al GelMA A (în funcție de timpul reacției de funcționalizare pentru gelatina A, 2H, 4H, 6H), și GelMA B, structurile chimice fiind adaptate după [13].

Protocolele utilizate pentru modificarea chimică a chitosan-ului, dextran-ului și gumei xantan sunt asemănătoare metodei utilizate pentru reacția gelatinei cu anhidrida metacrilică, solventul polimerului fiind modificat în funcție de proprietățile de solubilizare ale fiecărui component polimeric.

Acidul hialuronic (HA, masă moleculară de $M_w=1,5-1,8 \times 10^6$ Da) a fost modificat utilizând metacrilatul de glicidil (GMA), obținându-se HA metacrilat (HAGMA) [14,15]. În prima etapă s-a realizat o soluție de HA de concentrație 0,4%, utilizând apa distilată ca solvent. Pentru inițierea reacției, soluția de HA aflată sub agitare continuă a fost încălzită la 50°C , timp de o oră, simultan adăugării GMA și o soluție de acid p-toluen sulfonic (de concentrație 2%), realizată în N,N-dimetil formamidă (DMF).

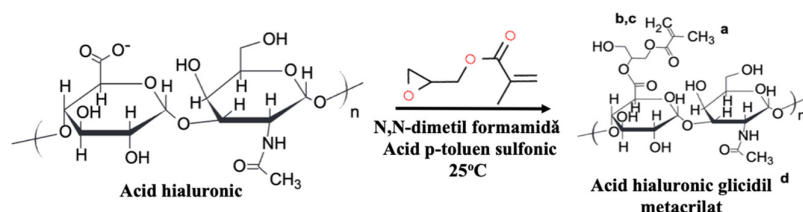


Figura 3. Reacția de funcționalizare a acidului hialuronic cu GMA [16,17].

S-a studiat influența raportului polimer/derivat glicidil asupra gradului de funcționalizare, realizându-se șapte reacții diferite de funcționalizare prin modificarea cantității de GMA. Reacțiile au fost realizate într-un interval de timp de 30 de ore, temperatură și agitare constante (25°C , 300 rpm).

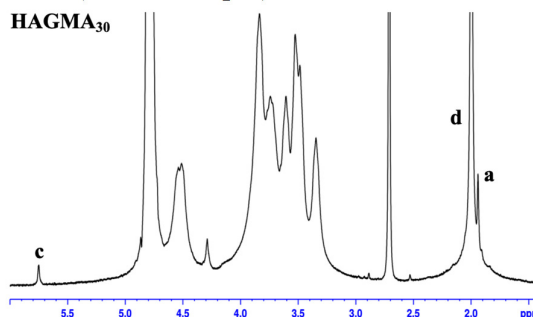


Figura 4. Spectrul ^1H RMN al acidului hialuronic modificat cu glicidil metacrilat (1:30 GMA).

Capitolul III. Hidrogeluri hibride pentru tratamentul leziunilor cutanate

Scopul acestui studiu a fost obținerea de noi hidrogeluri ca sisteme de administrare topică a medicamentelor pentru terapia cancerului de piele. Strategia de obținere a hidrogelurilor constă în procese de reticulare a unor biopolimeri (chitosan, dextran, xantan și gelatină) modificați anterior cu anhidridă metacrilică, cu acrilamidă și *N,N'*-metilenbis(acrilamidă). Modificarea chimică a polizaharidelor a îmbunătățit comportamentul acestora în reacția de reticulare. Hidrogelurile obținute au fost utilizate ca sisteme de administrare controlată de doxorubicină, un agent antitumoral care previne replicarea ADN-ului, afectează activitatea topoizomerazei II și funcționarea celulelor prin legarea de membrana celulară [34].

III.1. Metoda de obținere a hidrogelurilor hibride pe bază de polimeri cu grupări polymerizabile

Obținerea hidrogelurilor pe bază de dextran (fiind componenta polizaharidică constantă din compoziția tuturor hidrogelurilor), chitosan, gelatină și guma xantan, modificați anterior cu anhidridă metacrilică, a presupus mai multe etape.

Conform imaginii din Figura 5, în prima etapă au fost preparate soluțiile polimerice de DexMA 3% (g/v), CsMA 3% (g/v), GelMA 3% (g/v) și XGMA 3% (g/v), utilizând ca solvent o soluție tampon fosfat, 0,01 M, pH 7,2, sub agitare (300 rpm) până la obținerea unui amestec omogen.

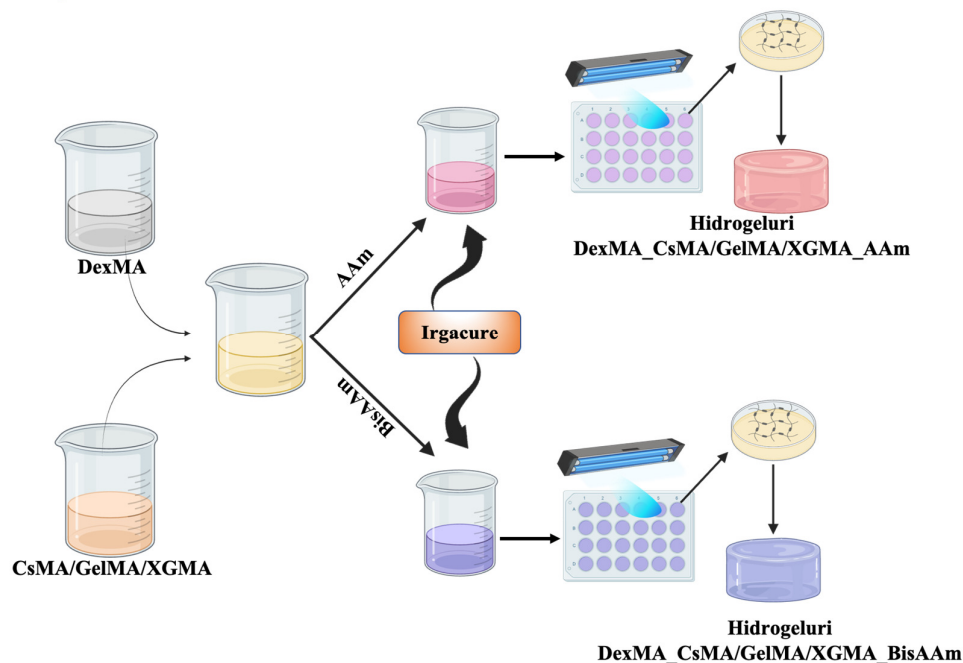


Figura 5. Etapele obținerii hidrogelurilor hibride DexMA_CsMA și DexMA_CsMA_AAm/BisAAm, DexMA_GelMA și DexMA_GelMA_AAm/BisAAm, DexMA_XGMA și DexMA_XGMA_AAm/BisAAm.

După omogenizarea amestecurilor, s-a adăugat agentul de fotoinițiere (Irgacure, 2% (g/v)) dar și acrilamidă (AAm, 10% (g/g) sau un amestec format din acrilamidă (AAm) și *N,N'*-metilenbis(acrilamidă)). Compoziția gelurilor este detaliată în Tabelul 1. Amestecurile obținute au fost turnate în plăci cu 24 de godeuri (câte 500 μ L/godeu) și expuse la lumină UV ($\lambda=365$ nm, 5 minute) pentru formarea rețelelor 3D.

Tabelul 1. Compoziția hidrogelurilor.

Hidrogeluri polimerice	DexMA (%)	CsMA (%)	GelMA (%)	XMA (%)	AAM (%)	BisAAM (%)
DexMA_CsMA	50	50	-	-	-	-
DexMA_CsMA_AAM	45	45	-	-	10	-
DexMA_CsMA_BisAAM	45	45	-	-	8	2
DexMA_GelMA	50	-	50	-	-	-
DexMA_GelMA_AAM	45	-	45	-	10	-
DexMA_GelMA_BisAAM	45	-	45	-	8	2
DexMA_XMA	50	-	-	50	-	-
DexMA_XMA_AAM	45	-	-	45	10	-
DexMA_XMA_BisAAM	45	-	-	45	8	2

III.1.1.Încărcarea hidrogelurilor hibride cu doxorubicină

Doxorubicina (Dox) [18] este un agent antitumoral indicat de FDA pentru tratarea unor de tipuri de cancer: leucemie limfoblastică acută, osteosarcoame, carcinom mamar, carcinom ovarian, carcinom tiroidian etc. Încărcarea cu medicament s-a realizat astfel: hidrogelurile realizate au fost imersate în soluție alcoolică de DOX (0,5 mg/mL, în alcool etilic) și menținute timp de 24 de ore, la întuneric, la 25°C. Solventul a fost îndepărtat prin uscare convectivă la 25°C. După uscare, hidrogelurile încărcate cu principiu activ au fost caracterizate din punct de vedere al capacității de eliberare al DOX și al citocompatibilității cu mediul celular.

III.1.1.1. Eliberarea de medicamente in vitro

Eliberarea *in vitro* a DOX din structura hidrogelurilor a fost efectuată prin imersarea acestora în PBS (pH=7,2, 0,01 M), la 37°C. Cantitatea de principiu activ înregistrată în urma procesului de eliberare a fost reprezentată grafic în funcție de timp (Figura 6).

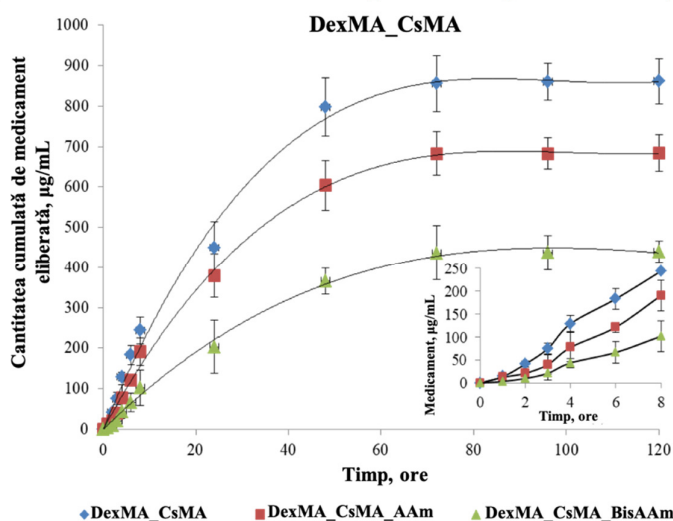


Figura 6. Cinetica de eliberare a doxorubicinei din hidrogeluri cu diverse compoziții.

Profilurile de eliberare ale hidrogelurilor DexMA_CsMA au indicat o eliberare constantă, controlată, concentrația maximă de medicament eliberată înregistrându-se după 50 de ore de experiment. În cazul hidrogelurilor ce conțin în compoziție AAM și AAM-BisAAM, cantitatea cumulată de medicament eliberată a fost mai mică: 80,56% pentru DexMA_CsMA, 64,2% pentru DexMA_CsMA_AAM_BisAAM și respectiv, de 42% pentru DexMA_CsMA_AAM_BisAAM. Acest fenomen poate fi explicat prin numărul mare de interacțiuni realizate între DOX și grupările laterale ale AAM/AAM-BisAAM din rețelele polimerice. La hidrogelurile DexMA_GelMA și DexMA_XGMA acest efect este atenuat.

Tabelul 2. Constanta vitezei de eliberare (k) și exponentul de eliberare (n).

Matricea încărcată	Coeficient de corelație (r2)		Constanta de eliberare, k (h ⁻ⁿ)	Exponentul mecanismului de eliberare, n
	Higuchi	Korsmeyer-Peppas		
DexMA_CsMA	0,9812	0,9955	0,1403	0,5629
DexMA_CsMA_AAm	0,9799	0,9962	0,1612	0,5719
DexMA_CsMA_BisAAm	0,9843	0,9987	0,1822	0,5685
DexMA_GelMA	0,9892	0,9904	0,1074	0,5270
DexMA_GelMA_AAm	0,9792	0,9973	0,0934	0,5374
DexMA_GelMA_BisAAm	0,9765	0,9965	0,0962	0,5907
DexMA_XGMA	0,9803	0,9944	0,0962	0,5507
DexMA_XGMA_AAm	0,9789	0,9952	0,0943	0,5531
DexMA_XGMA_BisAAm	0,9806	0,9986	0,1019	0,5496

Rezultatele obținute sugerează că în cazul tuturor hidrogelurilor, mecanismul care a guvernat cinetica de eliberare este de tip Korsmeyer-Peppas, coeficienții de corelație înregistrând valori ce depășesc 0,99 [19]. Pe lângă aceste date, s-au calculat și alți parametri, precum: constanta vitezei de eliberare (k) și exponentul de eliberare (n), pentru a determina mecanismul eliberării medicamentului din structura hidrogelurilor. Valorile obținute pentru exponentul (n) au sugerat un mecanism similar celui Fickian (n aproape egal cu 0,5), ceea ce a indicat că medicamentul este eliberat din hidrogeluri prin difuzie, relaxarea rețelelor 3D având doar o contribuție redusă. Toate aceste rezultate indică faptul că eliberarea doxorubicinei din matricea de hidrogel poate fi controlată prin selectarea polimerilor naturali/sintetici care stau la baza obținerii hidrogelului.

III.1.2.2. Studii de citotoxicitate și eliberare a medicamentului în culturi celulare

După 24 de ore de expunere a celulelor la cantitatea de doxorubicină eliberată din structura hidrogelurilor încărcate s-a determinat viabilitatea celulară, iar ca o consecință a eliberării medicamentului, valorile obținute au fost cuprinse între 43% - 66% (hidrogelul pe bază de gelatină având cel mai mic procent de celule viabile). După 48 de ore de experiment, tendința de scădere a valorilor viabilităților celulare s-a menținut, ajungând la 26-38%, iar după 72 de ore de experiment valorile s-au regăsit în intervalul 18-29%.

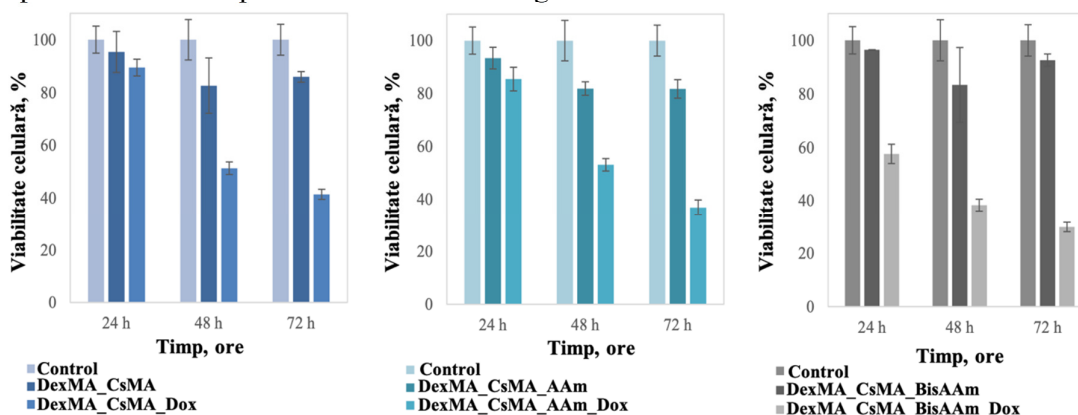


Figura 7. Viabilitatea celulară pentru hidrogeluri după 24 h, 48 h și 72 h de cultură celulară.

III.1.2.3. Morfologia celulară

Diferențele de viabilitate celulară ale celulelor ce au stat în contact direct cu hidrogelurile simple și cu cele încărcate cu medicament au fost analizate prin utilizarea reactivului Calceină AM.

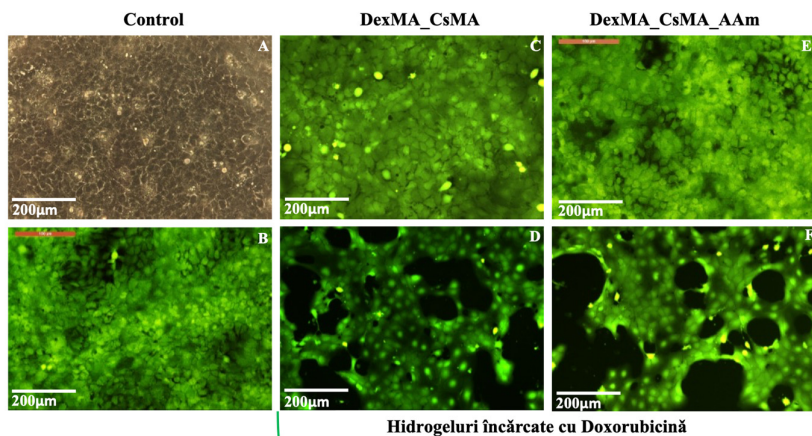


Figura 8. Morfologia celulelor după 4 zile de expunere la contactul direct cu DexMA_CsMA (C, D) și DexMA_CsMA_AAm (E, F) comparativ cu celulele din godeul martor (A (contrast de fază, B (colorat cu calcein AM)). Imaginile D, F prezintă efectul doxorubicinei eliberate din matricea de hidrogel asupra morfologiei și viabilității celulelor (colorare cu Calceină AM).

Rezultatele MTT pot fi corelate cu imaginile de morfologie celulară deoarece se poate observa că imaginile de morfologie ale acestora (Figura 8 C, E) sunt comparabile cu godeurile de control (Figura 8 A, B).

Pe de altă parte, rezultatele MTT ale matricelor încărcate cu doxorubicină pot fi corelate cu aspectul imaginilor de microscopie realizate în fluorescență (Figura 8 D, F), demonstrându-se eficacitatea medicamentului asupra capacității de diviziune a celulelor tumorale prin apariția zonelor nepopulate cu celule în comparație cu celulele neexpuse la medicament (Figura 8 C, E), unde suprafața godeului este populată complet.

III.2. Hidrogeluri hibride pe bază de acid hialuronic și o structură poliestică alifatică

Scopul cercetării a fost obținerea unor hidrogeluri hibride, prin utilizarea copolimerului poli(brazilat de etilenă-co-acid scuaric), PEBSA, alături de acidul hialuronic, și identificarea proprietăților sinergice pentru aplicarea lor în domeniul regenerării plăgilor epiteliale.

III.2.1. Metoda de obținere a gelurilor pe bază de PEBSA și acid hialuronic

Gelurile hibride au fost obținute prin amestecarea copolimerului sintetic, PEBSA și a biopolimerului, HA, în diverse proporții, conform Tabelului 3. Copolimerul PEBSA a fost preparat urmând protocolul realizat de Chiriac și colab.[16, 17]. Prima etapă a presupus realizarea soluțiilor de copolimer PEBSA 5% (utilizând 3 rapoarte între comonomeri, EB/SA, respectiv: 25/75, 50/50 și 75/25), în două tipuri de solvenți aprotici cu moment de dipol diferit, anume: dimetil sulfoxid (DMSO) și 1,4 dioxan. Cea de-a doua etapă a presupus obținerea propriu-zisă a hidrogelurilor prin amestecarea soluției apoase de HA 1% cu soluțiile de copolimer PEBSA, în diverse rapoarte (conform Tabelului 3). Formarea hidrogelurilor a avut loc într-un interval scurt de timp datorită formării rapide a legăturilor fizice de hidrogen între cei doi polimeri. În final, gelurile preparate au fost lăsate la maturat timp de 24 de ore și caracterizate, fie în stare nativă (teste reologice), fie după liofilizare (caracteristici fizico-chimice).

Tabelul 3. Compoziția hidrogelurilor pe bază de PEBSA_HA.

Nr.crt.	Denumirea probei	Tip de copolimer PEBSA	Raport PEBSA : HA (mL/mL)	Solvent
1	PEBSA_HA _{1.1}	25/75	1:1	DMSO
2	PEBSA_HA _{1.2}	25/75	1:2,5	DMSO
3	PEBSA_HA _{1.3}	25/75	1:2,5	1,4 Dioxan
4	PEBSA_HA _{1.4}	25/75	1:5	DMSO
5	PEBSA_HA _{2.1}	50/50	1:1	DMSO
6	PEBSA_HA _{2.2}	50/50	1:2,5	DMSO
7	PEBSA_HA _{2.3}	50/50	1:2,5	1,4 Dioxan
8	PEBSA_HA _{2.4}	50/50	1:5	DMSO
9	PEBSA_HA _{3.1}	75/25	1:1	DMSO
10	PEBSA_HA _{3.2}	75/25	1:2,5	DMSO
11	PEBSA_HA _{3.3}	75/25	1:2,5	1,4 Dioxan
12	PEBSA_HA _{3.4}	75/25	1:5	DMSO

III.2.1.1. Evaluarea proprietăților reologice

Figura 9 prezintă comportamentul reologic al gelurilor în condiții de forfecare oscilatorie, după aplicarea unor forțe de forfecare. În domeniul liniar de vâscoelasticitate, modulii elastic (G') și vâscos (G'') nu sunt influențați de frecvența de oscilație (ω). Structura tipică de gel a fost observată pentru majoritatea probelor analizate, acestea prezentând: $G' > G''$.

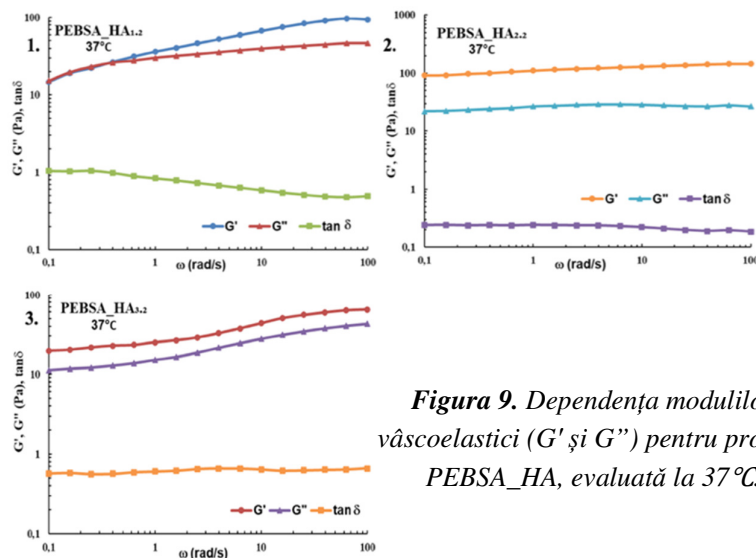


Figura 9. Dependența modurilor vâscoelastici (G' și G'') pentru probele PEBSA_HA, evaluată la 37°C.

Figura 9 (1, 2, 3) prezintă dependența modurilor vâscoelastici (G' și G'') și respectiv a vâscozității complexe în funcție de frecvența de oscilație. Probele analizate au prezentat un comportament tipic de gel ($G' > G''$, cu valori ale parametrilor G' și G'' independente de valorile frecvenței (ω)). În timpul experimentului s-a observat că modulul de elasticitate, care este corelat cu tăria gelului, este influențat de compoziția gelului. În ceea ce privește influența raportului dintre componente, există o structurare mai puternică în cazul probei PEBSA_HA_{2.2} (Figura 9.2) celelalte 2 geluri (PEBSA_HA_{1.2} – Figura 9.1 și PEBSA_HA_{3.2} – Figura 9.3) având o structură de gel mai puțin structurată.

III.3.1. Obținerea de sisteme bioactive care prezintă caracter antioxidant

Datorită rezultatelor promițătoare obținute în urma caracterizării hidrogelurilor hibride pe bază de PEBSA și HA, s-a realizat înglobarea unui principiu activ în structura acestora, și anume quercetina, în vederea evaluării posibilităților de aplicare. Acest flavonoid este un antioxidant eficient, care diminuează secreția citokinelor proinflamatorii (IL-1 β , IL-6, TNF- α), chemokinelor și a oxizilor nitrici [22], având o serie de efecte benefice, printre care și reducerea procesului fiziologic de îmbătrânire a pielii [23]. Încorporarea lui s-a realizat fie prin complexarea sa inițială cu structura copolimerului PEBSA și amestecarea cu o soluție apoasă de acid hialuronic, fie prin adăugarea lui ca atare în compoziția gelului PEBSA_HA.

III.3.1.1. Prepararea complexului copolimer/principiu bioactiv

Pentru obținerea complexului dintre PEBSA și quercetină (Q) s-au preparat două soluții distincte, una de PEBSA de concentrație 5% și cea de-a doua de compus bioactiv (Q), de concentrație 2,5%, pentru ambele fiind ales DMSO ca solvent datorită capacității ridicate de solubilizare a acestora comparativ cu 1,4-dioxanul.

Soluțiile au fost amestecate în raport gravimetric de 2:1 (PEBSA:Q) și lăsate sub agitare magnetică timp de 24 de ore.

III.3.1.2. Prepararea gelurilor bioactive

Prepararea hidrogelurilor pe bază de PEBSA, HA și quercetin s-a realizat prin trei metode diferite:

1) **PEBSA_HA_Q₁**: s-a bazat pe combinarea complexului PEBSA_Q cu HA. Practic, complexul PEBSA_Q a fost dispersat în DMSO, iar dispersia obținută a fost încorporată în soluția apoasă de HA 1% (conform Figurii 10);

2) **PEBSA_HA_Q₂**: s-a bazat pe încorporarea copolimerului sintetic PEBSA și a complexului PEBSA_Q în soluția de HA. Practic, s-a realizat o soluție de copolimer sintetic PEBSA 5%, utilizând DMSO, ca solvent. Apoi, la această soluție s-au adăugat, consecutiv, complexul PEBSA_Q și soluție apoasă de HA 1% (conform Figurii 10);

3) **PEBSA_HA_Q₃**: s-a bazat pe combinarea celor 3 compuși, simpli, PEBSA, quercetin și HA. Astfel, s-a realizat o soluție de PEBSA 5% folosind DMSO, apoi s-au adăugat, pe rând, soluția 1% HA în apă distilată, quercetină fiind încorporată în gelul format între PEBSA și acidul hialuronic (conform Figurii 10);

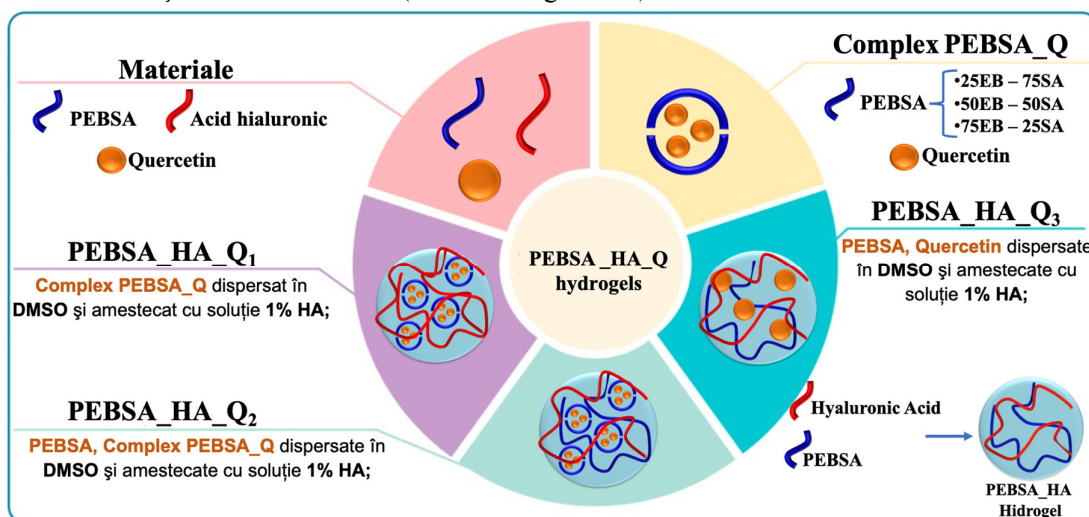


Figura 10. Metodele de obținere a hidrogelurilor hibride ce prezintă capacitate antioxidantă.

III.3.1.3. Activitatea antioxidantă

Proprietățile antioxidante ale flavonoidelor s-au dovedit a fi strâns legate de structura lor chimică. Transferul atomilor de hidrogen și donarea de electroni sunt cele două metode de bază prin care compușii fenolici își pot exercita efectele antioxidante [34]. În acest context și în mod interdependent cu activitatea antioxidantă necesară, se poate opta pentru varianta a doua de încapsulare a principiului activ (Figura 10). Însă, dacă se are în vedere obținerea unui efect antioxidant ridicat și constant în timp, acesta poate fi obținut prin încapsularea quercetinei utilizând varianta a 2-a de cuplare a acesteia în cadrul complexului HA și PEBSA, profil descris în graficele din Figura 11.

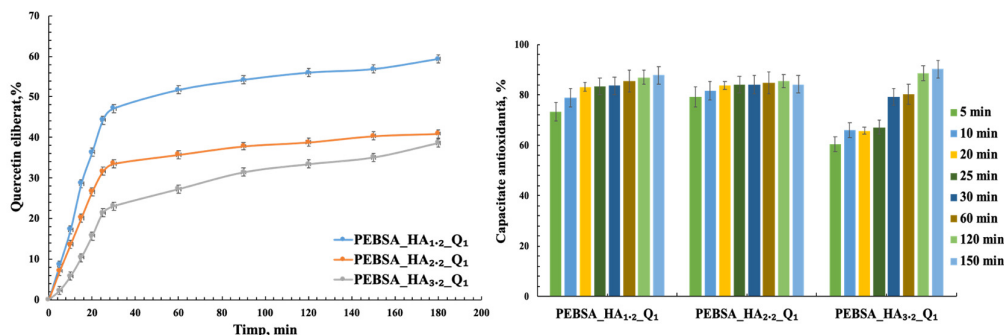


Figura 11. Evaluarea profilului de eliberare a quercetinelui din compoziția hidrogelurilor PEBSA_HA_Q (Q₁) corelat cu activitatea antioxidantă.

Capitolul IV. Arhitecturi hibride pe bază de gelatină metacrilată și PEGDA realizate prin tehnica imprimării 3D pentru aplicații în ingineria tisulară

Studiul a urmărit realizarea unor suporturi pe bază de GelMA (cu diferite grade de funcționalizare) și poli (etilen glicol) diacrilat (PEGDA) folosind tehnica de imprimare 3D. De-a lungul studiului, s-a avut în vedere evaluarea influenței gradului de modificare al gelatinei metacrilate asupra imprimabilității, morfologiei suporturilor, proprietăților fizico-chimice și biologice, pentru aplicații ale suporturilor în regenerarea țesutului moale, cu accent pe vindecarea plăgilor de la nivelul pielii.

IV.1. Obținerea cernelurilor pe bază de GelMA și PEGDA

GelMA A (cu diferite grade de metacrilare: GelMA A 2h (62%), GelMA A 4h (67%), GelMA A 6h (68%) și GelMA A 8h (72%)), un polimer sintetic, PEGDA și un fotoinițiator biocompatibil, fenil-2,4,6-trimetil-benzoil fosfinat de litiu (LAP) au fost amestecate în vederea obținerii unor geluri cu proprietăți reologice corespunzătoare procesului de imprimare.

IV.2. Proprietățile reologice ale gelurilor

Toate gelurile hibride prezintă proprietăți reologice superioare gelurilor obținute inițial, acestea fiind dobândite după aplicarea unor forțe de forfecare prelungite (Figura 12).

Aplicarea unor viteze mici de forfecare (sub $0,1 \text{ s}^{-1}$) determină un comportament newtonian, vâscozitatea (η) probelor fiind independentă de viteza de forfecare aplicată. La aplicarea unor viteze de forfecare cu valori cuprinse între $0,1 \text{ s}^{-1}$ și 100 s^{-1} , toate amestecurile prezintă un comportament pseudoplastic. Conform datelor de literatură [24,25], acest tip de comportament favorizează procesul de imprimare prin tehnica extrudării.

Astfel, în regiunea nenenewtoniană, vâscozitatea aparentă (η) este influențată de viteza de forfecare aplicată. Astfel, extrudarea gelului prin duză se poate realiza în mod facil.

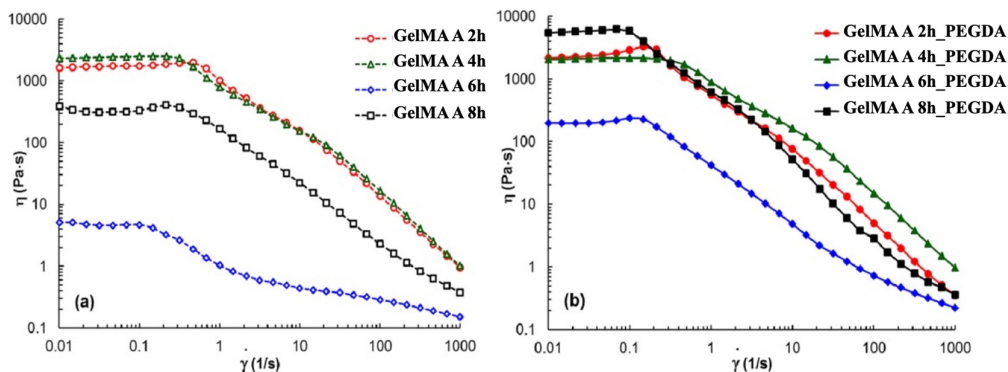


Figura 12. Vâscozitatea aparentă în funcție de viteza de forfecare aplicată gelurilor pe bază de GelMA (a) și GelMA_PEGDA (b) la 25°C.

IV.3. Proprietăți fizico-morfologice

Matricele pe bază de GelMA și GelMA_PEGDA prezintă o structură poroasă, cu formă neregulată a porilor și dimensiuni diferite, datorită fenomenului de sinereză ce se realizează în timpul procesului de liofilizare.

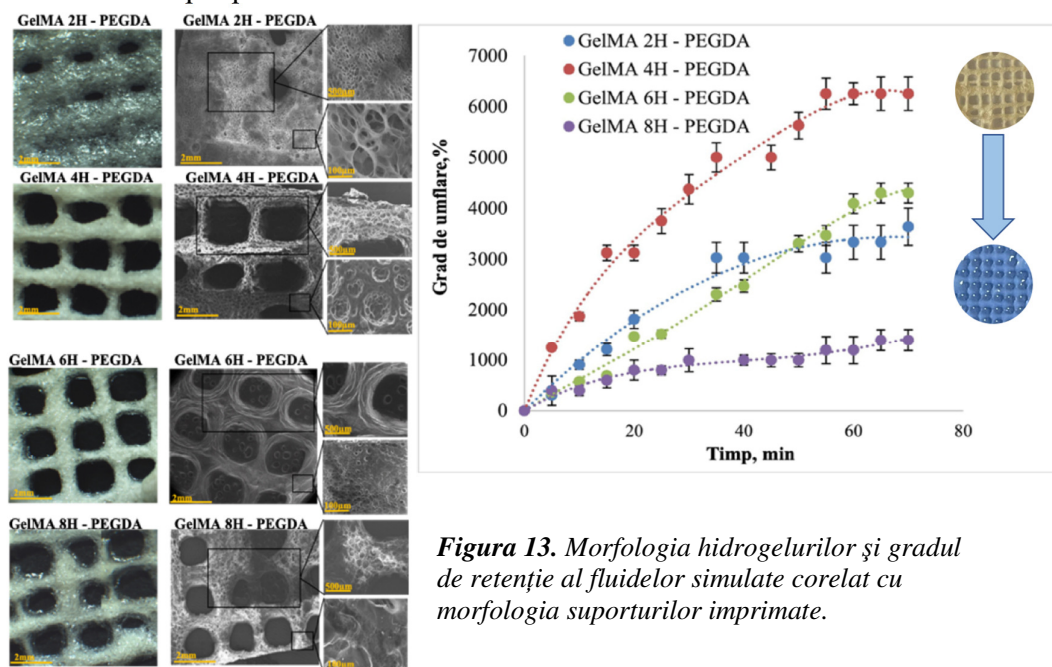


Figura 13. Morfologia hidrogelurilor și gradul de retenție al fluidelor simulate corelat cu morfologia suporturilor imprimate.

Gradul de substituție al polimerului GelMA și poziția grupării metacrilice pe lanțul proteic au influențat procesul de fotoreticulare, fiind factorii care contribuie la variația dimensiunii porilor. Porii sunt distribuiți uniform, ușor interconectați, favorabili pentru difuzia nutrienților, proliferarea celulelor, migrarea și aderarea acestora pe suprafața materialului.

Matricele pe bază de GelMA_PEGDA și-au păstrat forma, obținându-se valori ale gradelor de umflare cuprinse între 1000 și 6000%. În Figura 13 sunt reprezentate grafic valorile gradelor de umflare ale suporturilor imprimate 3D în funcție de timp. Conform graficelor se poate observa că toate suporturile au atins starea de echilibru de absorbție după 60 de minute de experiment.

IV.2. Suporturi hibride imprimate pe bază de acid hialuronic și PEBSA

Pentru a conferi forme și geometrii specifice structurilor, au fost obținute sisteme multicomponente pe bază de PEBSA, HA și GelMA, ulterior încărcate cu indometacin (IND) și profilate prin tehnica de imprimare 3D. Au fost evidențiate proprietăți precum: capacitatea de eliberare a IND și dependența acesteia de rapoartele dintre componente, compoziția suporturilor, dar și informații referitoare la interacțiunea matricelor cu mediul biologic.

IV.2.1. Metoda de obținere a cernelurilor

Anumite combinații de polimeri sintetici și naturali prezintă caracteristici sinergice, motiv pentru care pot fi utilizați pentru obținerea unor sisteme cu proprietăți îmbunătățite [20, 21]. Materialele sintetice prezintă proprietăți mecanice ridicate, simplificând procesul de imprimare și păstrând fidelitatea formei suporturilor imprimate, iar cele naturale prezintă proprietăți precum: produce răspuns imun redus, biocompatibilitate, biodegradabilitate și bioactivitate [28]. În vederea obținerii cernelurilor, s-au realizat amestecuri între copolimerul PEBSA (utilizând trei rapoarte între comonomeri EB și SA: 25/75, 50/50 și 75/25) și HA în raport de 1:2,5. Amestecurile obținute au prezentat vâscozitate redusă, acest lucru conducând la colapsarea suporturilor imprimate în timpul procesului de imprimare 3D. Pentru îmbunătățirea proprietăților reologice ale cernelurilor și, ulterior, ale proprietăților mecanice ale suporturilor imprimate, în compoziția cernelurilor a fost adăugată o cantitate constantă de gelatină metacrilată (GelMA A, grad de substituție de 68,07%). Pentru a fi încorporată în compoziția gelului inițial format din copolimerul PEBSA și acidul hialuronic, GelMA (20% g/v) a fost dizolvată în PBS (pH 7,2, 0,01 M) la 25°C, și ulterior s-a adăugat și agentul de inițiere a procesului de fotoreticulare, LAP (0,025% g/v). După omogenizare, cernelurile au fost analizate din punctul de vedere al proprietăților reologice și supuse procesului de imprimare 3D pentru obținerea suporturilor tridimensionale.

IV.2.2. Testarea proprietăților reologice

După cum se poate observa din Figura 14, proba PEBSA_HA_{2,2}_GelMA a prezentat recuperarea integrală a structurii după aplicarea diferitelor tipuri de forțe deformatoare (de până la 30,000 %), proba PEBSA_HA_{1,2}_GelMA prezentând un comportament similar.

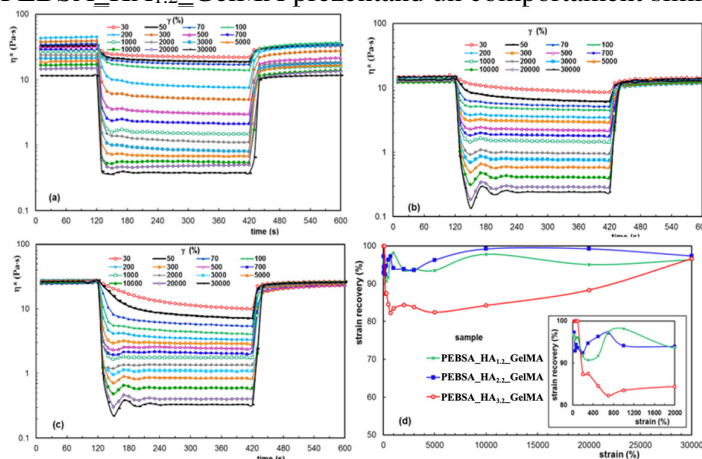


Figura 14. Comportamentul de auto-refacere a structurii după deformare, observat la gelurile reticulate (a)PEBSA_HA_{1,2}_GelMA; (b)PEBSA_HA_{2,2}_GelMA; (c)PEBSA_HA_{3,2}_GelMA; (d) Capacitatea de recuperare în funcție de forța aplicată pentru imprimarea gelurilor. În inset se prezintă recuperarea deformării pentru $\gamma \leq 2000$ %.

La aplicarea unor valori ale deformației cuprinse între 200% și 20,000%, proba PEBSA_HA_{3,2}_GelMA se poate recupera aproximativ 88-89% din valoarea inițială a

deformării. După aplicarea unor forțe de deformare mari care permit crearea de interacțiuni noi între macromolecule (întinderea completă a lanțului), recuperarea deformării crește. Pentru prevenirea deformării și asigurarea fidelității formei după extrudare, cerneala trebuie să reziste la forțe externe, de exemplu, la greutatea straturilor următoare care ar putea determina colapsarea și deformarea structurii matricei [29,30].

Comportamentul de subțiere prin forfecare și comportamentul de auto-refacere al cernelurilor obținute (timp scurt necesar recuperării și capacitate mare de recuperare a structurii, de peste 80%) asigură imprimabilitatea cernelurilor și fidelitatea formei suportului imprimat.

IV.2.6. Evaluarea citotoxicității in vitro

IV.2.6.1. Testul MTT

Testul MTT a fost utilizat pentru a evalua citotoxicitatea suporturilor pe culturi de fibroblaste abdominale de iepure. Figura 15 prezintă valorile de viabilitate celulară la contactul cu suporturile PEBSA_HA_GelMA. Rezultatele MTT au indicat o creștere a valorilor viabilității celulelor, la valori de 90% după 72 de ore de experiment (Figura 15).

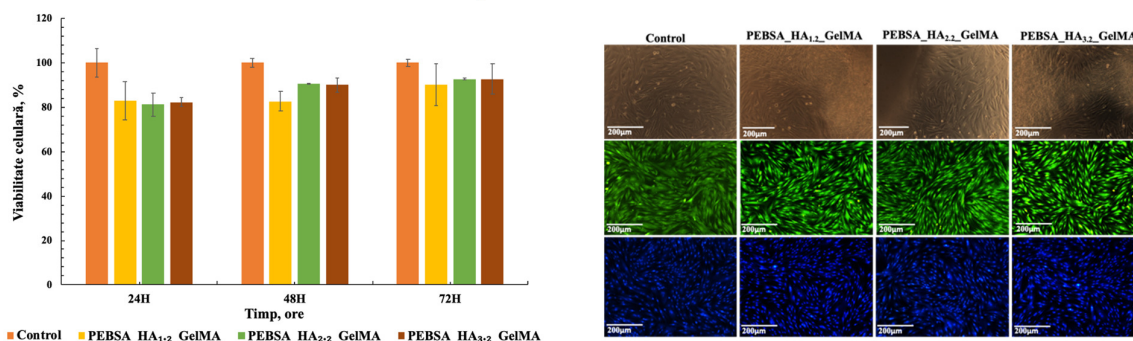


Figura 15. Viabilitatea celulară, celulele viabile și celule fixate, după 72 de ore de cultură celulară cu matricele pe bază de PEBSA_HA_GelMA.

Fibroblastele abdominale de iepure au fost expuse la contactul direct cu hidrogelurile PEBSA_HA_GelMA, timp de 72 de ore, înainte de a fi examinate morfologic prin colorare cu reactivul Calceină AM și cu reactivul DAPI. Imaginile surprinse cu un obiectiv x10, dovedesc prezența a numeroase celule vii, intacte din punct de vedere morfologic, aderate la substrat, formând un monostrat uniform, și cu formă normală caracteristică fibroblastelor.

Capitolul V. Obținerea prin imprimare 3D a suporturilor hibride pe bază de acid hialuronic modificat cu metacrilat de glicidil (HAGMA) și PEBSA

Studiul a avut în vedere obținerea unor cerneluri hibride cu proprietăți imprimabile pe bază de două componente, copolimerul PEBSA și HAGMA. Deoarece amestecarea acestor două componente nu conduce la obținerea de cerneluri imprimabile, după cum a fost descris în capitolul IV, s-a realizat îmbunătățirea proprietăților reologice ale acestor geluri prin modificarea structurii acidului hialuronic cu metacrilat de glicidil. Au fost obținute matrice HAGMA_PEBSA a căror proprietăți au fost studiate pentru demonstrarea posibilei aplicații în regenerarea țesuturilor epiteliale lezate. Pentru a le crește biofuncționalitatea, acestea au fost încărcate cu două principii active, ibuprofen [31] și eritromicină [32], medicamente pentru reducerea inflamației locale și, respectiv, a riscului de infecție la suprafața răni. Au fost evidențiate proprietăți precum: capacitatea de eliberare a celor două principii active, sinergismul lor și dependența acestora de rapoartele relative ale componentelor din compoziția suporturilor.

V.1. Metoda de obținere a matricelor polimerice

Pe baza studiilor reologice ale gelurilor pe bază de PEBSA/HA (prezentate în Capitolul III), pentru acest studiu a fost selectat raportul de 1:2,5 PEBSA/HAGMA. Conform Tabelului 4 s-au obținut 3 cerneluri distincte. În vederea obținerii cernelurilor, s-au realizat amestecuri între copolimerul PEBSA (utilizând variantele de copolimer 25/75, 50/50 și 75/25 diferența fiind dată de rapoartele dintre comonomeri, EB/SA) și acidul hialuronic metacrilat, în raport de 1:2,5. După omogenizare, s-a adăugat LAP, după care cernelurile au fost extrudate pentru a putea fi obținute suporturile.

Tabelul 4. Compoziția cernelurilor.

Nr.crt.	Denumirea probei	Tip copolimer PEBSA	Raport PEBSA:HAGMA (mL/mL)	Solvent HAGMA	Solvent PEBSA
1.	HAGMA_PEBSA ₁	25/75	2,5:1	Apă distilată	DMSO
2.	HAGMA_PEBSA ₂	50/50	2,5:1		
3.	HAGMA_PEBSA ₃	75/25	2,5:1		

V.1.1.2. Proprietăți fizico-morfologice

Morfologia suporturilor pe bază de copolimer sintetic PEBSA și HAGMA a fost analizată prin tehnica de microscopie electronică de baleiaj, observându-se că toate sistemele prezintă fidelitatea formei imprimate.

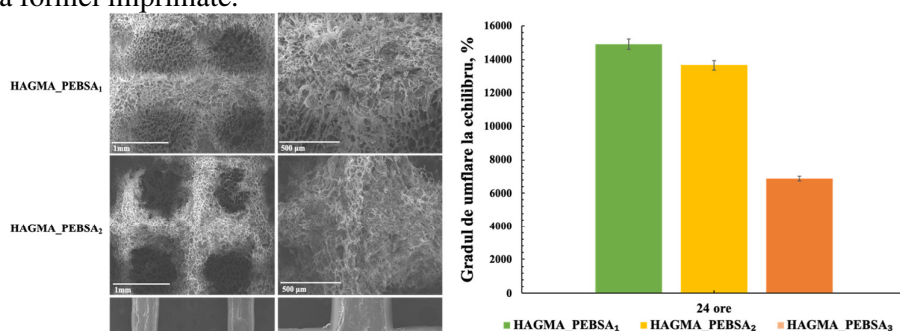


Figura 16. Morfologia hidrogelurilor și gradul de retenție al fluidelor simulate corelat cu morfologia suporturilor imprimate.

V.1.3. Încărcarea și profilul de eliberare al principiilor active din matrice

Pentru demonstrarea proprietăților de eliberare controlată a medicamentelor din suporturile pe bază de HAGMA și PEBSA, a fost necesară prepararea celor trei variante de amestecuri. În fiecare dintre aceste amestecuri, a fost adăugată o cantitate identică de două principii active, 5% raportat la cantitatea de polimer din soluție: ibuprofen și eritromicină.

Principiile active au fost adăugate în compoziția soluției de polimer după solvirea completă a acestuia, în solvent specific (apă distilată pentru HAGMA și dimetil sulfoxid pentru cele trei variante distincte ale PEBSA). După omogenizare, la amestecuri s-a adăugat soluție de LAP 0,01%, având rol de fotoinițiator.

Eliberarea principiilor active înglobate, ibuprofen și eritromicină, a fost studiată prin imersarea hidrogelurilor încărcate într-o soluție tampon fosfat de pH 7,2, 0,01M, pentru crearea mediului specific pielii lezate, experimentul realizându-se la 37°C. Rezultatele testelor de eliberare demonstrează că profilul de eliberare al principiilor active este influențat de compoziția hidrogelului, așa cum este ilustrat în graficele din Figura 18.

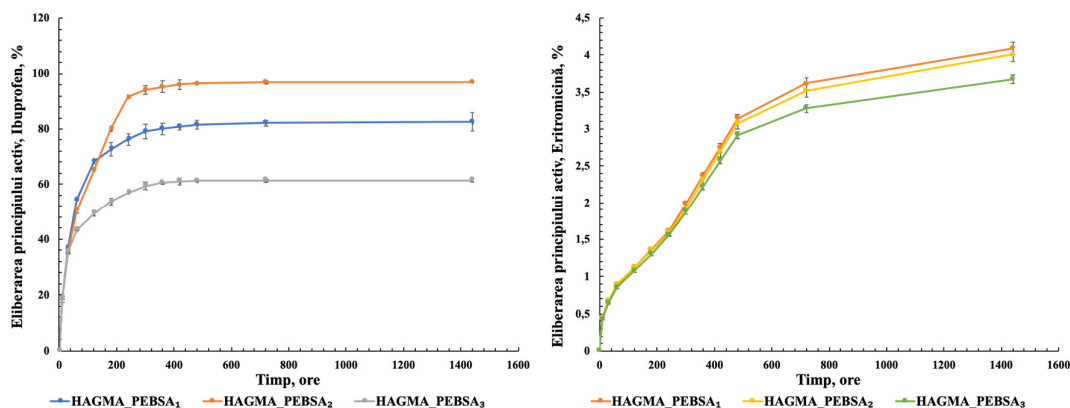


Figura 17. Cinetica de eliberare a celor două principii active, ibuprofen-eritromicină din structura hidrogelurilor HAGMA_PEBSA₁, HAGMA_PEBSA₂, HAGMA_PEBSA₃.

V.1.4. Teste de biocompatibilitate in vitro și in vivo

A fost testat răspunsul culturilor celulare de fibroblaste normale dermice umane la contactul cu hidrogelurile încărcate cu ibuprofen [33] și eritromicina [34]. Conform graficului din Figura 18, se observă că valorile viabilităților fibroblastelor normale dermice umane după contactul direct cu matricele polimerice se mențin ridicate și demonstrează caracterul non-citotoxic al materialelor (valori între 85-95%, după 72 de ore de experiment).

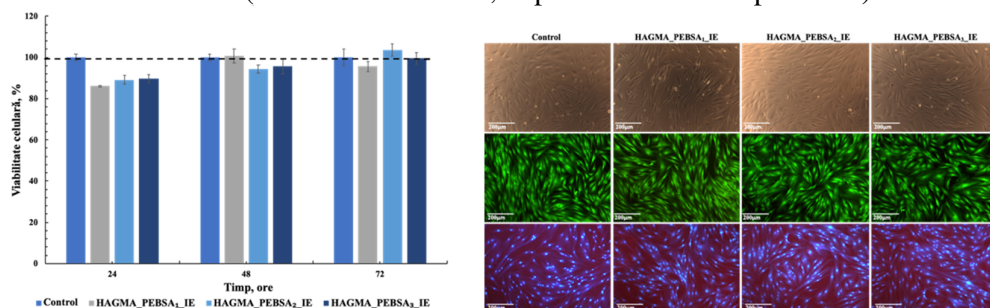


Figura 18. Viabilitatea celulară (%) pentru suporturile imprimare încărcate cu principii active, după 24, 48 și 72 de ore de experiment, măsurată prin tehnica MTT. Celule viabile fixate, după 72 de ore de contact direct cu matricele pe bază de HAGMA_PEBSA (10×).

În urma aplicării suporturilor HAGMA_PEBSA simple sau încărcate cu principii active s-a determinat capacitatea de apărare imună a animalelor prin determinarea parametrilor caracteristici, precum: capacitatea opsonică (CO) a serului și capacitatea bactericidă (CB). Conform graficelor reprezentate în Figura 19 s-a observat că matricele nu influențează acești parametri, valorile lor fiind comparabile celor din lotul animalelor de control, ceea ce demonstrează că aplicarea matricelor pe zona plăgii nu a determinat perturbarea capacității de apărare imună a șoarecelui, materialele neproducând reacții alergice, sau inflamatorii.

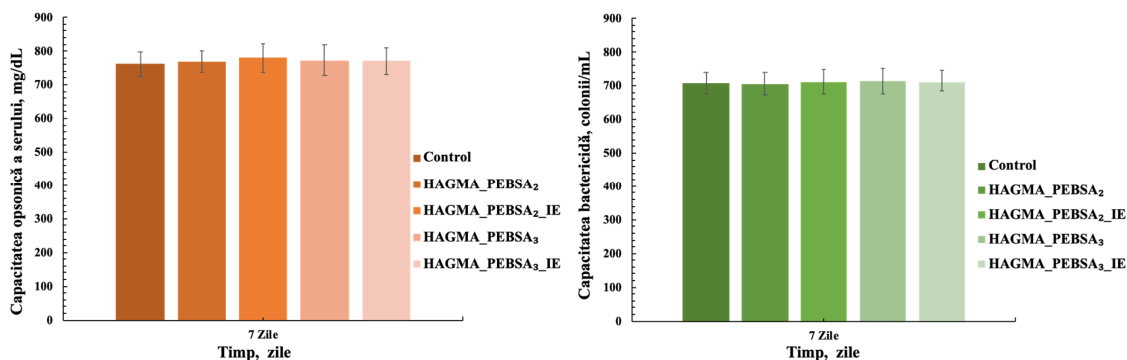


Figura 19. Influența matricelor imprimate asupra CO și CB la șoarece. Valorile sunt exprimate ca medie aritmetică a valorilor prin evaluarea probelor prelevate de la 5 animale/ grup.

Capitolul VI. Suporturi pe bază gelatină și chitosan metacrilat, acid hialuronic, nanoparticule magnetice, obținute prin imprimare 3D, pentru ingineria tisulară a țesutului osos

Studiul prezintă metodologia de obținere a unor cerneluri compozite imprimabile 3D pe bază de GelMA, două tipuri de chitosan metacrilat (LCsMA, HCsMA), acid hialuronic (HA), hidroxiapatită (HAp) și o suspensie coloidală de nanoparticule magnetice (MNP). S-a urmărit influența masei moleculare a chitosanului și a cantității de HAp asupra imprimabilității, morfologiei, proprietăților fizico-chimice și biologice ale matricelor destinate aplicațiilor BTE (domeniul medicinei regenerative a țesutului osos).

VI.1. Prepararea cernelurilor compozite și caracterizarea lor

Obținerea cernelurilor compozite a presupus realizarea unor soluții de polimeri funcționali (GelMA A, grad de substituție de 71,84%, HCsMA și LCsMA cu grade de substituție de 47,50% și respectiv 41,6%), acidul hialuronic, o suspensie coloidală de nanoparticule de magnetită cu înveliș de chitosan (MNP) cu diametru hidrodinamic cuprins între 140-400 nm, acestea fiind obținute conform metodei disponibile în articolul [35] și un material anorganic, hidroxiapatita (HAp).

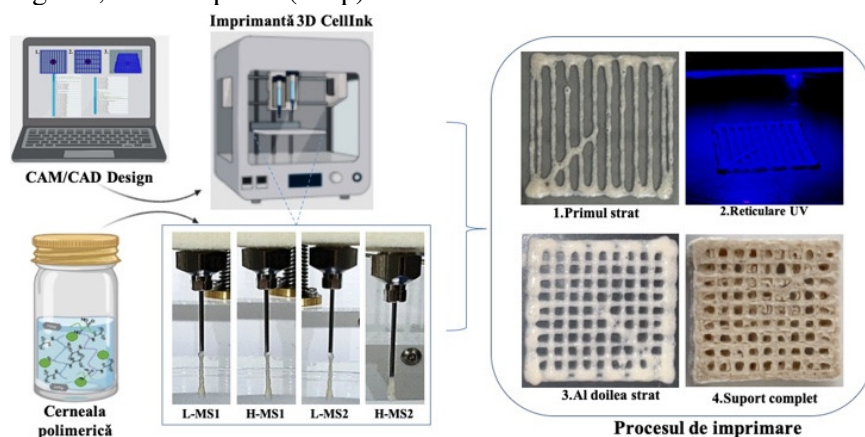


Figura 20. Prepararea matricei L/H-MS1 și L/H-MS2 foto-reticulate: 1) primul strat, 2) proces de reticulare, 3) al doilea strat, 4) matrice imprimată complet.

VI.1.1. Caracterizarea reologică a cernelurilor compozite

Comportamentul de subțiere prin forfecare favorizează extrudarea cernelii prin duză în timpul procesului de imprimare, reducând vâscozitatea cernelii la viteze mari de forfecare. Pentru păstrarea formei imprimate până la procesul de reticulare al suportului este necesară o valoare ridicată a pragului de tensiune. De asemenea, valoarea lui G' ar trebui să fie suficient de mare, indicând prevenirea colapsării ulterioare a structurii imprimate [36,37].

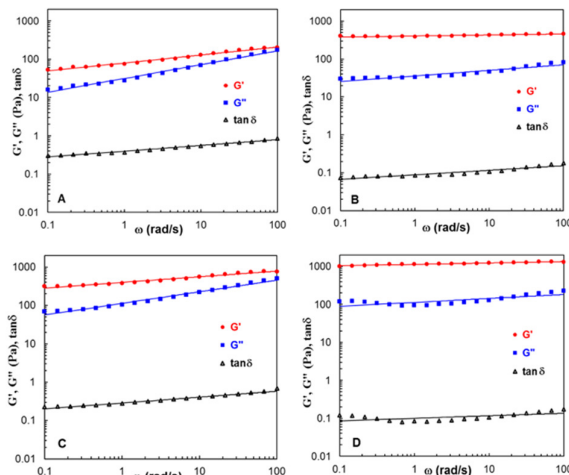


Figura 21. Parametrii vâscoelastici ai cernelurilor compozite reprezentate în funcție de frecvența de oscilație pentru $\gamma = 1\%$ (A) L-MS1; (B) H-MS1; (C) L-MS2; (D) H-MS2.

Regiunea vâscoelastică liniară (LVR) a fost determinată prin măsurarea modurilor vâscoelastici, G' și G'' , în funcție de amplitudinea deformării. În toate cazurile a fost atinsă limita domeniului vâscoelastic liniar de deformare (LRV, γ_L) de peste 10%, astfel, teste de baleiaj de frecvență au fost efectuate pentru $\gamma = 1\%$. Graficele din figura 21 A–D) prezintă variația modurilor vâscoelastici și a $\tan \delta$ în funcție de frecvența de oscilație pentru $\gamma = 1\%$ (în regiunea vâscoelastică liniară), la temperatura de 25°C.

VI.3. Proprietățile morfologice ale suporturilor

Suporturile obținute prezintă structură 3D cu pori interconectați, pe suprafața cărora se pot observa fie cristale de HAp, fie MNP, ce sunt distribuite în întreaga rețea polimerică.

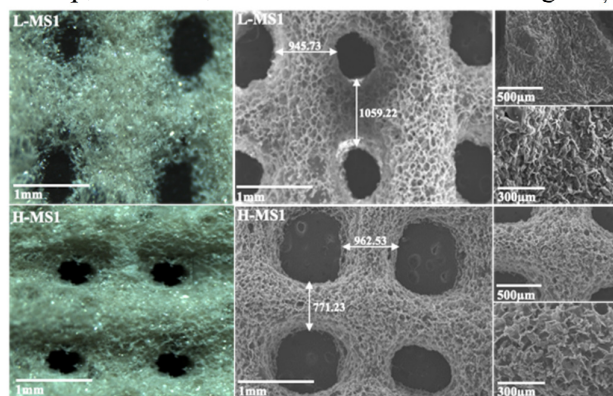


Figura 22. Imagini de stereomicroscopie și imagini de microscopie electronică de baleiaj pentru suporturile imprimare, H-MS.

Suporturile utilizate în aplicații ale ingineriei tisulare trebuie să prezinte anumite proprietăți structurale: caracteristici reologice adecvate, precum rezistența la curgere, dar și dimensiunea adecvată a porilor (dimensiuni cuprinse între 50 și 150 μm determină creșterea fibrovasculară iar cele între 150 și 500 μm contribuie la mineralizarea țesutului osos).

VI.4. Gradul de umflare

Valorile gradului de retenție al fluidelor (PBS, pH 7,2, 0,01M) în rețeaua 3D a suporturilor sunt prezentate în Figura 23. Se observă faptul că valorile sunt influențate de masa

moleculară a chitosanului funcționalizat, în special pentru matricele care conțin 50% HAp; valorile gradului de umflare pentru suportul L-MS2 au fost mai ridicate comparativ cu suportul H-MS2, fenomenul fiind constant încă de la începutul experimentului, fapt ce poate fi explicat prin crearea unui număr redus de punți de reticulare, de tipul GelMA-GelMA, GelMA-HCsMA/LCsMA, HCsMA-HCsMA sau LCsMA-LCsMA, în acest caz.

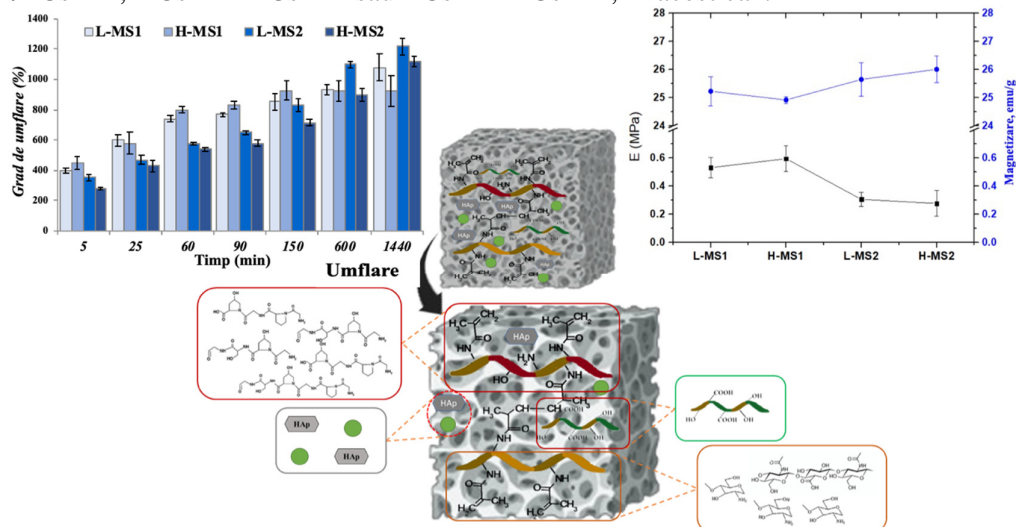


Figura 23. Comportamentul la umflare al matricelor compozite și Modulul Young (E , MPa) și magnetizarea (emu/g) pentru L-MS și H-MS.

Coroborarea rezultatelor a arătat că suporturile prezintă proprietăți adecvate pentru implantarea lor în os. Conținutul de hidroxiapatită a influențat puternic caracteristicile mecanice ale suporturilor. Datele obținute prin evaluarea suporturilor din perspectiva modulului Young recomandă implantarea matricelor obținute în zone cu solicitare biomecanică redusă.

CAPITOLUL VII. Arhitecturi biohibride pe bază de polimeri funcționalizați obținute prin tehnica (bio)imprimării 3D

Studiul și-a propus analiza influenței naturii și masei moleculare a gelatinei asupra dezvoltării unor cerneluri și suporturi biohibride cu proprietăți inovatoare, pe bază de amestecuri între GelMA (A și B), XGMA și acid hialuronic (HA), realizate prin tehnica imprimării 3D utilizând metoda extrudării. De-a lungul studiului s-au analizat proprietățile suporturilor polimerice, precum: gradul de retenție al fluidelor simulate, biodegradabilitatea, capacitatea de adeziune la suprafața țesutului epitelial, interacțiunea lor cu mediul celular (prin contactul direct al acestora cu fibroblastele normale umane și keratinocite normale) pentru a le demonstra versatilitatea, permițând astfel utilizarea lor în obținerea de suporturi prin procese de (bio)imprimare și aplicabilitate în medicina regenerativă, anume pentru vindecarea rănilor.

VII.1. Prepararea cernelurilor pentru obținerea suporturilor hibride

Pentru obținerea suporturilor imprimate s-au preparat cerneluri pe bază de două tipuri de gelatină (cu origini diferite: porcină de tip A și bovină de tip B), XG și HA. Gelatinele și XG au fost supuse unor transformări polimer-analoage (prin transformări polimer - analoage cu MA), timp de 6 ore, obținându-se polimeri funcționalizați cu grade de substituție de 71,84% și respectiv 63,02% (pentru gelatine) și 12% în cazul XG, conform metodologiei de obținere și a rezultatelor testelor de caracterizare prezentate în capitolul II. Cernelurile au fost realizate prin dizolvarea polimerilor în mediul de cultură (DMEM F₁₂ HAM), cu un conținut de 0,01% LAP,

soluție realizată prin menținere la temperatură constantă de 60°C, timp de 30 de minute, conform protocolului producătorului (Sigma Aldrich, Germania).

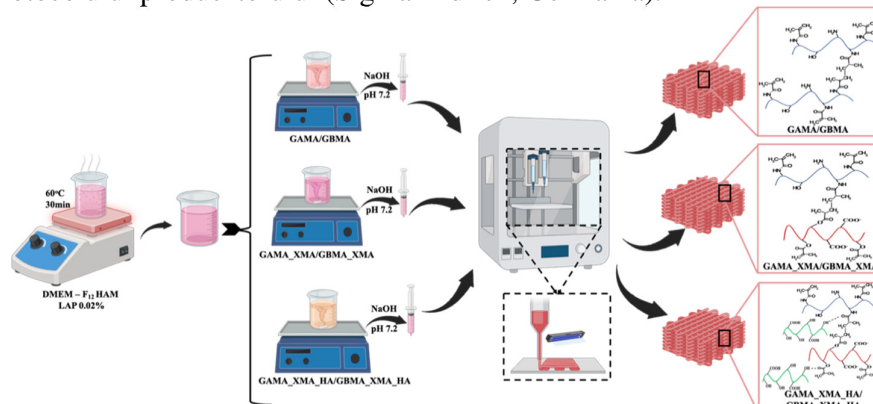


Figura 24. Etapele obținerii suporturilor GAMA/GBMA_XMA și GAMA/GBMA_XMA_HA.

VII.1.1. Analize reologice

Pentru toate compozițiile, limita superioară a domeniului de vâscoelasticitate liniară, LVR (γ_{LVR}), a fost atinsă la valori ale deformației, γ , de peste 60 %, cu $G' > G''$ și $\tan\delta < 0,2$ pentru $\gamma < \gamma_{LVR}$, sugerând un comportament similar materialelor solide.

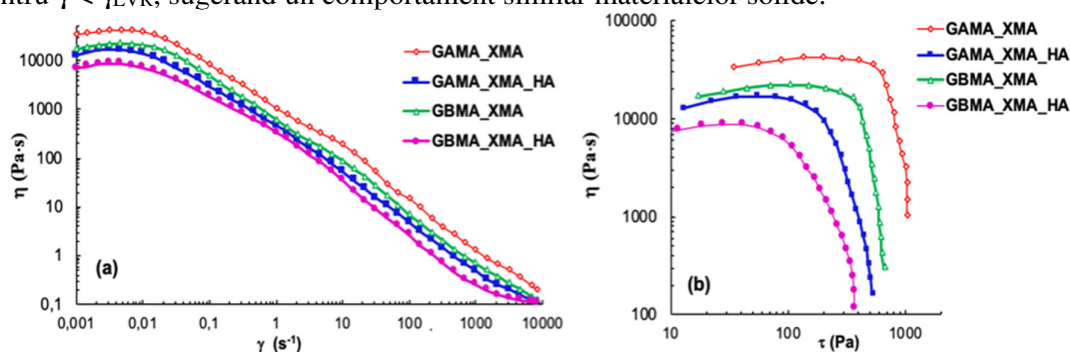


Figura 25. Variația vâscozității amestecurilor în funcție de (a) viteza de forfecare și (b) efortul de forfecare.

Rezistența gelului în compoziția cărora se găsește HA este redusă, fiind mai mică în cazul gelurilor ce au în compoziție GBMA, comparativ celor cu GAMA.

Valorile pragului de tensiune la curgere (τ_0) reprezentate în Figura 25 pot fi, de asemenea, corelate cu rezistența gelului la aplicarea unor presiunii ridicate pentru a putea fi extrudat prin duze în vederea obținerii suporturilor 3D.

VII.1.3. Teste de migrare celulară (wound healing)

Vindecarea rănilor [38] este un proces complex care implică diverse tipuri de celule, caracteristice dermului, epidermului și leucocite. Acest proces este reglat de citokine și factori de creștere. Datorită faptului că matricele realizate prin tehnica imprimării 3D au ca aplicabilitate vindecarea rănilor, s-a avut în vedere studierea efectului pe care acestea îl determină asupra fenomenului de migrare al celulelor. Pentru acest studiu s-au utilizat celule care au rol important în procesul de regenerare al țesutului epitelial, fibroblaste umane dermice (linia celulară NHDF), în generarea matricei extracelulare.

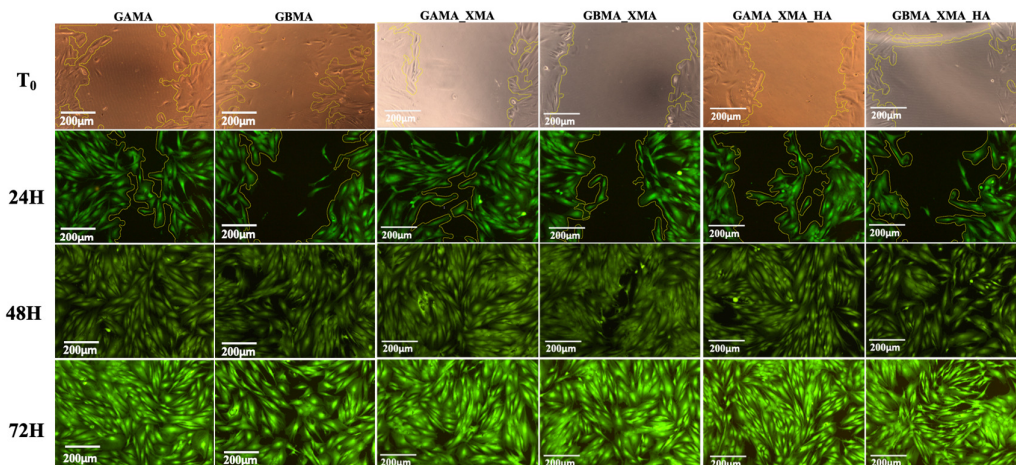


Figura 26. Evaluarea *in vitro* a migrării fibroblastelor umane normale dermice în prezența hidrogelurilor GAMA/GBMA_XMA și GAMA/GBMA_XMA_HA (evidențiat cu reactivul Calcein AM în diferite momente).

Pentru cuantificarea interleukinelor, s-a prelevat, după 72 ore de contact, mediu de cultură din plăcile Petri în care au fost populate suporturile imprimate 3D cu fibroblaste. În urma prelucrării datelor obținute s-a observat că valorile controlului (celule ce nu au stat în contact cu materialele) au valori ale concentrației de interleukine reduse comparativ cu valorile concentrațiilor obținute în urma testării mediului de incubare al materialelor populate ceea ce demonstrează că probele determină secreția de IL-6, implicat în vindecarea rănilor. Valoarea concentrației controlului a fost de 219,9 pg/mL în timp ce valorile concentrațiilor de IL-6 din plăcile cu materiale a fost ridicat, anume: 545,3 pg/mL (GAMA), 539,9 pg/mL (GAMA_XMA), 603,8 pg/mL (GAMA_XMA_HA), 691,2 pg/mL (GBMA), 410,9 pg/mL (GBMA_XMA) și 643,5 pg/mL (GBMA_XMA_HA). S-a constatat că cel mai bun răspuns imun îl prezintă suporturile în a căror compoziție se găsește HA, recunoscut pentru activitatea lui regenerativă.

VII.2. Arhitecturi biohibride realizate prin tehnica imprimării 3D cu aplicații în regenerarea leziunilor cutanate

Obiectivul cercetării a avut în vedere realizarea unor bioarhitecturi cu structură bistratificată prin depunerea pe o bază de celuloză populată cu keratinocite a unui suport GelMA_AlGMA populat cu fibroblaste normale umane. În afara proprietăților fizico-chimice s-a urmărit activitatea imunologică, prin testul ELISA, după care matricele au fost aplicate pe suprafața unor plăgi realizate pe un animal model (șoarece).

VII.3. Obținerea de suporturi biohibride prin bioimprimare 3D

Bioimprimarea 3D este o tehnică de biofabricare prin care se pot controla o serie de parametri, anume: depunerea celulelor, a componentelor matricei extracelulare și a factorilor biochimici pentru crearea de structuri cu arhitecturi bine definite prin depunerea strat cu strat a cernelurilor polimerice sau a biocernelurilor [39]. Tehnica de bioimprimare 3D permite obținerea de structuri complexe cu proprietăți biomimetice, apropiate țesuturilor fiziologice. În acest context, s-a propus obținerea de suporturi bioimprimate pe bază de GelMA și AlgMA. În urma testelor de caracterizare realizate anterior, pentru obținerea de suporturi bioimprimate s-a utilizat amestecul polimeric obținut la raport egal între polimerii funcționalizați, GelMA_AlGMA₂.

VII.3.1 Obținerea de arhitecturi biohibride bistratificate

Pentru obținerea suporturilor imprimate 3D bistratificate s-au urmat o serie de etape distincte. Prima a presupus obținerea, prin tehnica imprimării utilizând tehnica prin extrudare a suporturilor pe bază de GelMA și AlgMA (GelMA_AlgMA), dar și pregătirea membranei de celuloză și liofilizarea ambelor componente.

În cea de-a doua etapă, s-a realizat sterilizarea, prin expunere la radiații UV a materialelor. Pregătirea membranei de celuloză pentru popularea cu keratinocite umane a presupus depunerea pe suprafața acesteia a unui strat de soluție de collagen 0,1%, realizată în mediu complet de cultură.

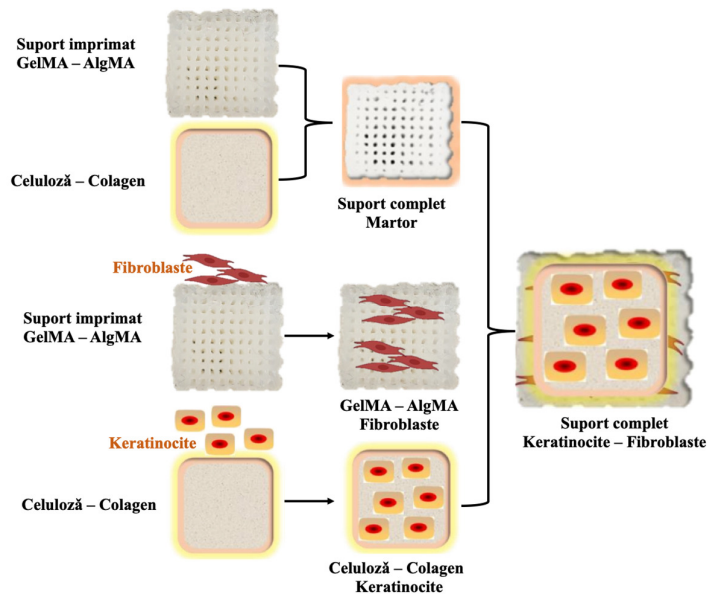


Figura 27. Etapele obținerii structurilor biohibride bistratificate GelMA_AlgMA_celuloză (liniile celulare NHDF/HACAT).

Suporturile imprimate au fost imersate în mediu de cultură și incubate la 37°C pentru 3 ore și populate cu fibroblaste dermice umane normale (linia celulară NHDF). Acestea au fost incubate separat timp de 1 săptămână după care cele două tipuri de suporturi au fost suprapuse și incubate din nou pentru o săptămână, mediul fiind schimbat la fiecare 2 zile cu unul proaspăt. După finalizarea acestor etape structurile realizate au fost supuse testării prin interacțiunea cu mediul biologic (*in vivo*).

VII.3.3. Teste *in vivo*

În vederea realizării experimentului *in vivo*, a fost selectat un număr de 54 de șoareci CD1, câte 18 șoareci/grup (grupul M – martor, grupul C - suport 3D (GelMA_AlgMA₂) cu celule (fibroblaste și keratinocite) și grupul FC - suport 3D fără celule).

La începutul experimentului, au fost efectuate 108 plăgi, câte 2 plăgi/șoarece. La intervale de 7, 14 și 21 zile, a fost măsurată dimensiunea plăgilor și, în urma eutanasierii a 6 șoareci/grup, au fost recoltate probe în vederea examinării histologice și imunohistochemice.

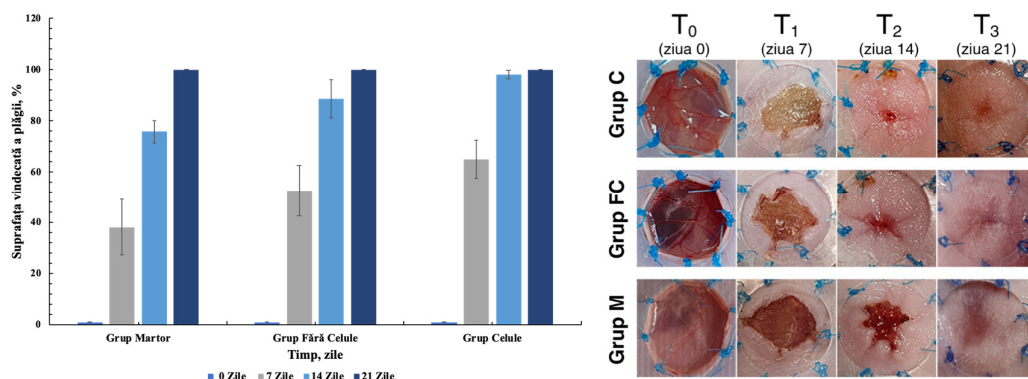


Figura 28. Suprafața vindecată a plăgii în funcție de timp și evoluția clinică a procesului de vindecare.

VII.3.4. Evaluări histologice și imunohistochimice

După 21 de zile de experiment, s-a observat refacerea completă a epidermului în grupurile C și FC, și în curs de organizare în grupul M. La evaluarea plăgilor din grupurile C și FC dermul și hipodermul prezentau structură normală, cu fibre conjunctive dispuse ordonat, indicând o vindecare completă. În grupul M, dermul și fibrele conjunctive prezentau ușoară dezorganizare.

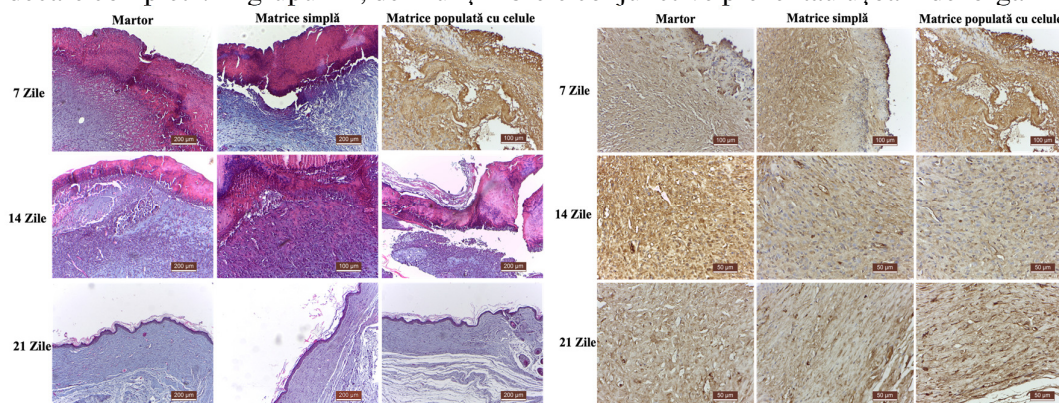


Figura 29. Rezultatele examenului histologic prin metoda tricromică Masson și ale examenului imunohistochimic (activitatea VEGF pentru leziunile în contact cu matricea simplă și matricea biohibridă), colorare prin metoda Hematoxilină-Eozină.

VII.3. Obținerea de suporturi biohibride prin bioimprimare 3D

Bioimprimarea 3D este o tehnică de biofabricare prin care se pot controla o serie de parametri și anume: depunerea celulelor, a componentelor matricei extracelulare și a factorilor biochimici pentru crearea de structuri cu arhitecturi bine definite prin depunerea strat cu strat a cernelurilor polimerice sau a biocernelurilor [39].

Cernelurile pe bază de GelMA și AlgMA, au permis bioimprimarea cu celule. Viabilitatea celulară a variat între 78,2% și 85,3%, pentru suporturile analizate. Cuantificarea numărului de celule viabile după finalizarea procesului de imprimare 3D a biocernelurilor și incubarea matricelor populate, s-a realizat prin raportarea numărului de celule viabile din suport la numărul total de celule aflate în suspensia celulară adăugată în compoziția amestecului polimeric ce a fost supusă procesului de bioimprimare.

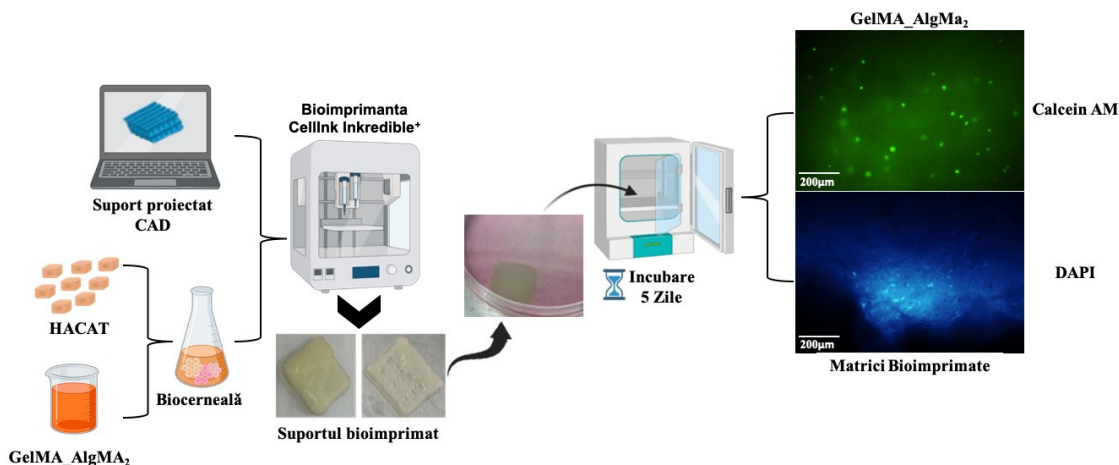


Figura 30. Etapele procesului de bioimprimare 3D.

Concluzii

Din studiile realizate au rezultat următoarele aspecte:

Reacții de funcționare ale polimerilor de origine naturală

Testele au evidențiat obținerea unor polimeri naturali funcționali, și anume:

- (i) GelMA cu diferite grade de modificare între 46% și 64%, în funcție de timpul de reacție cu anhidrida metacrilică;
 - (ii) CsMA (42%);
 - (iii) AlgMA (12%);
 - (iv) XGMA (10%);
 - (v) HAGMA, cu grade reduse de modificare în funcție de cantitatea de monomer adăugată (valorile fiind cuprinse între 32-53%);
- ⇒ Toate gradele de substituție au fost cuantificate prin spectroscopie RMN și FT-IR, rezultatele modificărilor fiind comparabile cu cele din literatura de specialitate.
- ⇒ Interacțiunea dintre polimerii funcționali și mediul biologic a demonstrat obținerea unor polimeri biocompatibili prin cuantificarea unor valori ridicate ale viabilităților, demonstrând non-citotoxicitatea produșilor rezultați în urma reacțiilor de modificare.
- ⇒ Imaginile de morfologie celulară au susținut valorile viabilităților celulare, prezentând obținerea unui monostrat confluent pe suprafața godeurilor, celulele având formă specifică fibroblastelor, alungită, fusiformă.

S-au obținut polimeri funcționali cu grupări metacrilice cu aplicabilitate biomedicală, prin intermediul unor transformări polimer-analoage cu anhidridă metacrilică sau metacrilat de glicidil, pentru formarea unor rețele polimerice prin procese de reticulare/autoreculare, cu aplicabilitate biomedicală.

Hidrogeluri hibride pentru tratamentul leziunilor cutanate

Studiul ce a avut în vedere realizarea de hidrogeluri hibride, cu aplicații în tratamentul cancerului tegumentar prin eliberarea localizată a doxorubinei, a demonstrat obținerea de matrice pe bază de combinații între dextran și chitosan/gelatină/guma xantan (a căror catenă a

fost modificată cu anhidridă metacrilică). Pentru formarea unor structuri tip retea s-au adăugat AAm și BisAAm, evidențindu-se ulterior efectul antitumoral al matricelor obținute prin diverse metode de caracterizare.

- ⇒ Analiza spectrală FT-IR a demonstrat că adăugarea compușilor de reticulare a condus la formarea unui număr mai mare de interacțiuni covalente.
- ⇒ Imersarea în fluid simulat (soluție tampon fosfat de pH 7,2) a matricelor polimerice a demonstrat că toate hidrogelurile ating la echilibru un grad ridicat de umflare, datele obținute putând fi corelate și cu structura morfologică a hidrogelurilor (porozitate și distribuția porilor).
- ⇒ Eliberarea Dox din matricele de hidrogel a avut loc în două etape: o primă etapă caracterizată de un proces rapid de eliberare urmată de un profil de eliberare lent și controlat. Acest comportament este adecvat recomandărilor legate de administrarea topică a principiilor active în terapia cancerului de piele. Aspectele legate de profilurile de eliberare ale Dox au fost demonstrate și susținute de aplicarea modelelor cinetice Higuchi and Korsmeyer-Peppas.

S-a demonstrat că hidrogelurile încărcate cu Dox prezintă eficiență asupra keratinocitelor tumorale (linia A431), datele indicând că hidrogelurile exercită un efect de reducere a diviziunii celulare, inducând apoptoza și fiind promițătoare pentru aplicarea în terapia tumorală.

Hidrogeluri hibride pe bază de acid hialuronic și PEBSA

Studiul a avut în vedere obținerea unor noi tipuri de hidrogeluri pe bază de PEBSA și HA, cărora li s-au conferit proprietăți antioxidante prin adăugare de quercetincu aplicabilitate în ingineria țesutului cutanat și, anume în vindecarea rănilor.

- ⇒ Formarea rețelelor de gel a fost confirmată prin teste reologice, majoritatea sistemelor realizate prezentând valori specifice ale parametrilor vâscoelastici: $G' > G''$ și $\tan \delta < 1$.
- ⇒ Prin spectroscopie FT-IR s-a demonstrat formarea legăturilor de hidrogen între grupările $C=O$ din structura lanțului PEBSA și grupările $-OH$ de pe catena HA.
- ⇒ Gradele de retenție obținute prin imersia hidrogelurilor în fluide simulate demonstrează că matricele prezintă proprietăți caracteristice materialelor superabsorbante, având valori ridicate ale gradelor de umflare la echilibru, ce depășesc 2000%. Testarea materialelor pe bază de PEBSA_HA, prin metoda MTT, realizate pe culturi de fibroblaste abdominale de iepure a demonstrat că de-a lungul celor 3 zile de experiment, viabilitatea celulară s-a menținut la valori de peste 90%, confirmând posibilitatea utilizării acestor materiale în aplicații biologice.
- ⇒ Încapsularea principiului activ, quercetina, în structura matricei s-a realizat prin trei metode distincte. Activitatea antioxidantă a fost demonstrată utilizând testul cu reactivul DPPH, studiul demonstrând posibilitatea modulării profilului de eliberare al principiului activ, quercetina, interdependent cu răspunsul antioxidant necesar: pentru activitate antioxidantă pentru un timp îndelungat, quercetina trebuie introdusă în timpul formării matricei (având loc formarea legăturilor fizice intermoleculare între quercetină, HA și PEBSA) iar pentru o activitate antioxidantă cu efect rapid, flavonoidul trebuie să fie cuplat printr-o procedură de complexare cu polimerul PEBSA, urmată de adăugarea de HA.

Materialele obținute prezintă interdependențe între diferitele caracteristici fizico-chimice ale polimerilor precum reologia, proprietățile morfologice dar și cele biologice precum biocompatibilitatea, proprietăți care le fac potrivite pentru aplicații biomedicale, în special în tratarea rănilor cutanate.

Arhitecturi hibride pe bază de GelMA și PEGDA realizate prin tehnica imprimării 3D cu aplicații în ingineria tisulară

S-a avut în vedere obținerea de suporturi prin prototipare rapidă a matricei pe bază de cerneluri imprimabile prin metoda extrudării. Cernelurile au fost obținute prin amestecarea polimerului GelMA (cu diverse grade de substituție), fotoinițiator și PEGDA. Proprietățile suporturilor au fost evaluate prin diverse metode de caracterizare în vederea demonstrării faptului că gradul de substituție al polimerului modificat influențează parametrii de imprimare, proprietățile reologice ale gelurilor GelMA_PEGDA și proprietățile fizico-chimice ale matricelor realizate prin imprimarea gelurilor.

- ⇒ Rezultatele testelor de reologie au evidențiat faptul că gelurile GelMA_PEGDA prezintă rețele cu proprietăți vâscoelastice, specifice GelMA, valori scăzute ale efortului de curgere și comportament de subțiere prin forfecare, caracteristici importante pentru procesele de imprimare prin tehnica extrudării.
- ⇒ În condiții fiziologice simulate, suporturile 3D prezintă un comportament specific hidrogelurilor superabsorbante. Probele își mențin stabilitatea în timp, proprietate dobândită prin adăugarea polimerului PEGDA.
- ⇒ Interacțiunea suporturilor cu mediul celular a fost evidențiată prin evaluarea valorilor viabilității a două linii celulare specifice țesutului epidermic (fibroblaste și keratinocite). Ambele tipuri de celule și-au menținut viabilitatea, prezentând valori ce depășesc 95% după 3 zile de experiment, demonstrând că matricele pot fi aplicate în procese de regenerare a țesuturilor moi deoarece nu influențează desfășurarea mecanismelor de proliferare a celulelor.
- ⇒ Caracteristicile de bioadezivitate sunt îmbunătățite semnificativ atunci când polimerul PEGDA este implicat în realizarea rețelei 3D.

În concluzie, coroborarea tuturor rezultatelor a arătat că structurile de hidrogel pe bază de GelMA și PEGDA, realizate prin imprimare 3D prezintă caracteristici adecvate pentru aplicațiile de inginerie a țesuturilor moi.

Suporturi hibride imprimate pe bază de HA și PEBSA

Studiul a urmărit obținerea unor hidrogeluri hibride pe bază de PEBSA, o copolimer de lactonă sintetică, și HA, o polizaharidă cu proprietăți biocompatibile, urmată de adăugarea în compoziție de GelMA pentru obținerea unor cerneluri cu proprietăți aplicabile în procesele de imprimare 3D. Pentru utilizarea materialelor ca plasturi cu efect antiinflamator, matricele imprimate au fost încărcate cu indometacin.

- ⇒ Testele de reologie au evidențiat obținerea unor geluri bazate pe PEBSA, HA și GelMA cu proprietăți vâscoelastice, rezistență la curgere și comportament de subțiere prin aplicarea unor forțe de forfecare, proprietăți adecvate pentru utilizarea lor ca cerneluri imprimabile.

- ⇒ Analiza spectrală FT-IR a evidențiat prezența benzilor caracteristice grupărilor prezente în GelMA și a demonstrat formarea legăturilor de hidrogen între legăturile C=O ale lanțurilor de PEBSA și grupările -OH ale lanțurilor de HA.
- ⇒ Microscopia SEM atestă formarea unor structuri 3D, ce păstrează forma imprimată, prezintă porozitate adecvată creării unui mediu biomimetic pentru susținerea creșterii și dezvoltării celulelor.
- ⇒ De asemenea, hidrogelurile imprimate prezintă structuri compacte, capabile de înglobare și eliberare controlată a principiului activ ales, indometacin.
- ⇒ Testele de retenție ale fluidelor simulate demonstrează că, în condiții fiziologice, matricele prezintă capacitate de absorbție ridicată atribuită prezenței GelMA în compoziție.
- ⇒ Pentru a evalua citocompatibilitatea, suporturile polimerice au fost puse în contact direct cu fibroblaste abdominale de iepure (iepure albinos). De-a lungul experimentului, desfășurat pe o perioadă de 72 de ore, valori de viabilitate de 80%, au confirmat posibilitatea utilizării materialelor obținute pentru aplicații biologice ulterioare.

Citotoxicitatea redusă și biocompatibilitatea foarte bună ale matricelor, alături de proprietățile structurale, morfologice și fizico-chimice, indică potențialul suporturilor de a fi utilizate în aplicații medicale, cum ar fi plasturii pentru medicina personalizată.

Obținerea prin imprimare 3D de suporturi hibride pe bază de HAGMA și PEBSA

Studiul confirmă obținerea unor hidrogeluri pe bază de PEBSA și HA funcționalizat cu metacrilat de glicidil pentru a obține suporturi stabile prin procese de (bio)imprimare 3D prin tehnica extrudării. Pentru aplicarea probelor ca plasturi cu efect antiinflamator și bacteriostatic, pentru vindecarea rănilor, matricele imprimate au fost încărcate cu două principii active, ibuprofen și eritromicină.

- ⇒ Analiza spectrală FT-IR a demonstrat formarea legăturilor de hidrogen între grupările C=O ale lanțului PEBSA și -OH al lanțului HAGMA.
- ⇒ De asemenea, s-a demonstrat încărcarea principiilor active prin apariția pe spectre a benzilor specifice medicamentelor.
- ⇒ Microscopia SEM atestă formarea unei structuri 3D poroase, influențată de compoziția copolimerului sintetic PEBSA, care poate crea un mediu biomimetic pentru creșterea și dezvoltarea celulelor. Astfel, hidrogelurile imprimate prezintă structuri compacte, utile pentru înglobarea și eliberarea controlată de principii active.
- ⇒ Pentru evaluarea proprietăților legate de citocompatibilitate, fibroblastele umane normale au fost puse în contact direct cu suporturile simple cât și cu cele încărcate,. De-a lungul experimentului, desfășurat pe o perioadă de 72 de ore, celulele au menținut valori de viabilitate de peste 80%, oferind dovezi în favoarea utilizării materialelor obținute pentru aplicații biologice ulterioare.
- ⇒ În completarea testelor de citocompatibilitate s-au realizat teste *in vivo* prin aplicarea suporturilor la nivelul unei incizii dorsale realizate pe șoareci albi Swiss. Rezultatele obținute au demonstrat că matricele nu determină modificări semnificative la nivelul parametrilor hematologici, biochimici și imunologici, comparativ cu utilizarea plasturilor comerciali.

Coroborarea tuturor rezultatelor, precum cele legate de proprietățile de biocompatibilitate, alături de proprietățile structurale, morfologice și fizico-chimice, dar și a rezultatelor evidențiate prin aplicarea matricelor pe modele animale (șoarece) indică potențialul suporturilor de a fi utilizate în aplicații medicale, cum ar fi platurii cu proprietăți antibacteriene și antiinflamatorii aplicabili în medicina personalizată.

Suporturi pe bază gelatină/chitosan modificat, acid hialuronic, nanoparticule magnetice obținute prin imprimare 3D pentru ingineria tisulară a țesutului osos

Au fost concepute matrice cu proprietăți reglabile pentru aplicații ale BTE, fiind realizate prin utilizare unei tehnici de imprimare 3D prin metoda extrudării. Acestea au fost realizate prin obținerea unor cerneluri compozite pe bază de gelatină metacrilată, chitosan metacrilat cu greutate moleculară mică/mare, acid hialuronic, hidroxiapatită și nanoparticule magnetice. Stabilitatea suportului și rezistența mecanică au fost asigurate prin reticularea acestuia, imediat după procesul de extrudare, grupările metacrilat fiind anterior activate prin adăugarea unui fotoinițiator netoxic, LAP.

- ⇒ Conform rezultatelor reologice, amestecurile pe bază de chitosan funcționalizat cu masa moleculară mică prezintă imprimabilitate superioară comparativ cernelurilor pe bază de chitosan cu masa moleculară mare și cantitate similară de hidroxiapatită, realizate în condiții de procesare identice.
- ⇒ Imaginile SEM au confirmat formarea suporturilor cu structură 3D și a rețelelor cu pori interconectați, cu dimensiuni variind între 50-150 μm, ceea ce este în acord cu datele din literatură privind dimensiunea osteoblastelor, parametrii fiind potriviți pentru popularea cu celule.
- ⇒ Testele realizate pe culturi celulare *in vitro* (linia de celule MG-63, osteoblaste, viabilitate și morfologie) au demonstrat că suporturile 3D sunt citocompatibile.

S-a demonstrat că prin adaptarea raportului dintre faza polimerică și hidroxiapatită, pot fi dezvoltate, prin metode de imprimare 3D, matrice ce pot avea aplicații în procesele de regenerare osoasă și terapii regenerative.

Arhitecturi biohibride pe bază de polimeri funcționalizați realizate prin tehnica (bio)imprimării 3D

Studiul s-a concentrat pe dezvoltarea și caracterizarea unor noi suporturi polimerice pe bază de GelMA (A și B), XGMA și HA, imprimate 3D prin extrudare, cu aplicații în medicina regenerativă. În cercetarea întreprinsă s-au obținut cerneluri pe bază de gelatină, gumă de xantan (anterior funcționalizați cu anhidridă metacrilică) și acid hialuronic.

Acidul hialuronic a fost adăugat ca adjuvant în procesul de aderare celulară, respectiv biocompatibilitate, dar și în vederea obținerii unei vâscozități adecvate a cernelii în procesul de imprimare tridimensională.

- ⇒ Formarea rețelelor de gel a fost confirmată prin teste reologice, sistemele realizate prezentând valori specifice ale parametrilor vâscoelastici: $G' > G''$ și $\tan \delta < 1$.

-
- ⇒ Cernelurile pe bază de hidrogel GelMA(A și B), XGMA și HA, au fost obținute și reticulate la 365 nm.
 - ⇒ Suporturile au fost testate din punct de vedere al structurii morfologice, demonstrându-se obținerea unor structuri poroase, cu valori ale porilor de 50-160 μm, valori care sprijină aderarea și dezvoltarea fibroblastelor.
 - ⇒ Din punctul de vedere al interacțiunii cu mediul celular s-au evidențiat valori ale viabilității celulare ce depășesc 90%, demonstrând citocompatibilitatea suporturilor. Imaginile de microscopie, atât cele în contrast de fază cât și cele realizate în fluorescență au demonstrat că suporturile nu au o influență negativă asupra formei și dezvoltării celulare, celulele păstrând forma fusiformă caracteristică, formând un monostrat confluent pe suprafața godeurilor.

S-a demonstrat că suporturile obținute pot fi utilizate în aplicații ale ingineriei medicinei regenerative. De asemenea, în urma cercetării efectuate s-a observat și impactul pozitiv al polimerilor XGMA și HA, care aduc îmbunătățiri semnificative caracteristicilor de imprimabilitate și performanțelor mecanice ale suporturilor imprimate.

Arhitecturi biohibride realizate prin tehnica imprimării 3D cu aplicații în regenerarea leziunilor cutanate

Studiul s-a concentrat pe dezvoltarea și caracterizarea atât a unor noi suporturi polimerice pe bază de GelMA A, AlgMA, imprimate 3D prin extrudare, cât și a unor suporturi bistratificate obținute din două tipuri de suporturi populate cu două liniicelulare, cu posibile aplicații în medicina regenerativă. În cercetarea întreprinsă s-au realizat cerneluri pe bază de gelatină și alginat de sodiu (anterior funcționalizați cu funcții metacrilice). Gelatina a fost aleasă datorită susținerii fenomenului de aderare celulară. Catena de alginat de sodiu fiind funcționalizată a demonstrat o capacitate mai mare de interacțiune cu mediul celular.

- ⇒ Din punct de vedere al interacțiunii cu mediul celular s-au evidențiat valori ale viabilității celulare ce depășesc 90%, demonstrând citocompatibilitatea suporturilor.
- ⇒ Testarea arhitecturilor bistratificate a demonstrat că utilizarea unui suport polimeric 3D populat cu celule influențează semnificativ viteza de vindecare a plăgilor în comparație cu procesul natural de vindecare.
- ⇒ Analizele histologice și imunohistochimice au demonstrat că suportul 3D populat cu celule nu doar accelerează reducerea suprafeței plăgii, dar și stimulează factorii de regenerare epidermică esențiali pentru procesul de vindecare.
- ⇒ Astfel, suportul polimeric 3D populat cu celule a demonstrat o capacitate superioară de vindecare a plăgii, efect care poate fi atribuit interacțiunilor complexe dintre celule și matricea tridimensională, care creează un microambient propice regenerării.

Rezultatele subliniază potențialul ansamblurilor 3D populate cu celule pentru îmbunătățirea tratamentului plăgilor, deschizând noi direcții pentru cercetare și aplicare clinică.

Concluzii finale

Teza de doctorat intitulată “Arhitecturi polimerice hibride concepute ca structuri hidrogel” a avut ca obiectiv general **dezvoltarea unor noi sisteme hibride** realizate fie prin metode de procesare convenționale cât și prin utilizarea tehnicii de prototipare rapidă prin extrudare. Noutatea studiilor a constat în obținerea unor structuri complexe (cerneluri) pe bază de biopolimeri funcționalizați cu grupări polimerizabile și polimeri sintetici, prin tehnica de imprimare 3D. Mai mult decât atât studiile au permis și dezvoltarea unei biocerneluri utilizând imprimarea 3D prin extrudare și sisteme polimerice ce reprezintă un pas inovator, deschizând calea către structuri personalizate și versatile în domeniul ingineriei tisulare.

Perspective

Ca perspective, direcțiile de cercetare dezvoltate în cadrul tezei de doctorat vor fi extinse și orientate spre:

- studii aprofundate asupra polimerilor funcționalizați cu proprietăți imprimabile;
- continuarea studiilor asupra sistemelor cu structuri complexe, stratificate;
- aprofundarea studiilor privind sisteme imprimabile ce prezintă în compoziție suspensii celulare;
- optimizarea proprietăților unor matrice de tip hidrogel hibrid prin adăugarea de molecule biologice pentru dezvoltarea de sisteme cu proprietăți optime pentru utilizarea în culturile celulare;

Referințe bibliografice

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science*, 260:920–6, 1993. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>.
- [2] Sampogna G, Guraya SY, Forgione A. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*;3:101–7, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2015.05.002>.
- [3] Han F, Wang J, Ding L, Hu Y, Li W, Yuan Z, Guo Q, Zhu C, Yu L, Wang H, Zhao Z, Jia L, Li J, Yu Y, Zhang W, Chu G, Chen S, Li B. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. *Front Bioeng Biotechnol*;8:83, 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00083>.
- [4] Thang NH, Chien TB, Cuong DX. Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview. *Gels*;9:523.2023. <https://doi.org/10.3390/gels9070523>.
- [5] Lau HK, Kiick KL. Opportunities for Multicomponent Hybrid Hydrogels in Biomedical Applications. *Biomacromolecules*;16:28–42, 2015. <https://doi.org/10.1021/bm501361c>.
- [6] Echeverria Molina MI, Malollari KG, Komvopoulos K. Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol*;9:617141, 2021. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.617141>.
- [7] Prete S, Dattilo M, Patitucci F, Pezzi G, Parisi OI, Puoci F. Natural and Synthetic Polymeric Biomaterials for Application in Wound Management. *JFB*;14:455, 2023. <https://doi.org/10.3390/jfb14090455>.
- [8] Abdelghany AM, Menazea AA, Ismail AM. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Chitosan/Polyvinyl Alcohol blend doped with Hibiscus Sabdariffa L. extract. *Journal of Molecular Structure*;1197:603–9, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.07.089>.
- [9] Ashfaq A, Clochard M-C, Coqueret X, Dispenza C, Driscoll MS, Ulański P, Al-Sheikhly M. Polymerization Reactions and Modifications of Polymers by Ionizing Radiation. *Polymers*;12:2877, 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12122877>.

-
- [10] GhavamiNejad A, Ashammakhi N, Wu XY, Khademhosseini A. Crosslinking Strategies for 3D Bioprinting of Polymeric Hydrogels. *Small*;16:2002931, 2020. <https://doi.org/10.1002/smll.202002931>.
- [11] Camci-Unal G, Cuttica D, Annabi N, Demarchi D, Khademhosseini A. Synthesis and Characterization of Hybrid Hyaluronic Acid-Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules*;14:1085–92, 2013. <https://doi.org/10.1021/bm3019856>.
- [12] Thattaruparambil Raveendran N, Vaquette C, Meinert C, Samuel Ipe D, Ivanovski S. Optimization of 3D bioprinting of periodontal ligament cells. *Dental Materials*;35:1683–94, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.08.114>.
- [13] Zhu M, Wang Y, Ferracci G, Zheng J, Cho N-J, Lee BH. Gelatin methacryloyl and its hydrogels with an exceptional degree of controllability and batch-to-batch consistency. *Sci Rep*;9:6863, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42186-x>.
- [14] Ibrahim S, Kothapalli CR, Kang QK, Ramamurthi A. Characterization of glycidyl methacrylate – Crosslinked hyaluronan hydrogel scaffolds incorporating elastogenic hyaluronan oligomers. *Acta Biomaterialia*;7:653–65, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.006>.
- [15] Tavsanlı B, Okay O. Mechanically strong hyaluronic acid hydrogels with an interpenetrating network structure. *European Polymer Journal*;94:185–95, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.07.009>.
- [16] Poostforooshan J, Rennecke S, Gensch M, Beuermann S, Brunotte G-P, Ziegmann G, Weber AP. Aerosol Process for the *In Situ* Coating of Nanoparticles with a Polymer Shell. *Aerosol Science and Technology*;48:1111–22, 2014. <https://doi.org/10.1080/02786826.2014.964354>.
- [17] Bencherif SA, Srinivasan A, Horkay F, Hollinger JO, Matyjaszewski K, Washburn NR. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials*;29:1739–49, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.047>.
- [18] Johnson-Arbor K, Dubey R. Doxorubicin. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
- [19] Trucillo P. Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release. *Processes*;10:1094, 2022. <https://doi.org/10.3390/pr10061094>.
- [20] Chiriac AP, Stoleru E, Rosca I, Serban A, Nita LE, Rusu AG, Ghilan A, Măcsim A-M, Mititelu-Tartau L. Development of a new polymer network system carrier of essential oils. *Biomedicine & Pharmacotherapy*;149:112919, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112919>.
- [21] Chiriac AP, Asandulesa M, Stoica I, Tudorachi N, Rusu AG, Nita LE, Chiriac VM, Timpu D. Comparative study on the properties of a bio-based copoly(lactone) system. *Polymer Testing*;109:107555, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2022.107555>.
- [22] Batiha GE-S, Beshbishy AM, Ikram M, Mulla ZS, El-Hack MEA, Taha AE, Algammal AM, Elewa YHA. The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. *Foods*;9:374, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9030374>.
- [23] Salehi B, Machin L, Monzote L, Sharifi-Rad J, Ezzat SM, Salem MA, Merghany RM, El Mahdy NM, Kılıç CS, Sytar O, Sharifi-Rad M, Sharopov F, Martins N, Martorell M, Cho WC. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega*;5:11849–72, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01818>.
- [24] Cernencu AI, Lungu A, Stancu I-C, Serafim A, Heggset E, Syverud K, Iovu H. Bioinspired 3D printable pectin-nanocellulose ink formulations. *Carbohydrate Polymers*;220:12–2, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.026>.
- [25] Armstrong AA, Pfeil A, Alleyne AG, Wagoner Johnson AJ. Process monitoring and control strategies in extrusion-based bioprinting to fabricate spatially graded structures. *Bioprinting*;21:e00126, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00126>.
- [26] Satchanska G, Davidova S, Petrov PD. Natural and Synthetic Polymers for Biomedical and Environmental Applications. *Polymers*;16:1159, 2014. <https://doi.org/10.3390/polym16081159>.
- [27] Gutierrez Cisneros C, Bloemen V, Mignon A. Synthetic, Natural, and Semisynthetic Polymer Carriers for Controlled Nitric Oxide Release in Dermal Applications: A Review. *Polymers*;13:760, 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13050760>.
- [28] Gopinathan J, Noh I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater Res*;22:11, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0122-1>.
- [29] Bercea M. Rheology as a Tool for Fine-Tuning the Properties of Printable Bioinspired Gels. *Molecules*;28:2766, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28062766>.
- [30] Townsend JM, Beck EC, Gehrke SH, Berkland CJ, Detamore MS. Flow behavior prior to crosslinking: The need for precursor rheology for placement of hydrogels in medical applications and for 3D bioprinting. *Progress in Polymer Science*;91:126–40, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.01.003>.
- [31] Bhardwaj A, Misra K. Allopathic Remedies. Management of High Altitude Pathophysiology, Elsevier, p. 205–15, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813999-8.00010-0>.

-
- [32] Taranum N, Khatoon S, Dzantiev BB. Perspective and application of molecular imprinting approach for antibiotic detection in food and environmental samples: A critical review. *Food Control*;118:107381, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107381>.
- [33] Abbasi K, Eftekhari Ashtiani R, Abdolahi M, Hosseini M, Sayyad Soufdoost R, Alam M, Fani-Hanifeh S. Effect of Collagen/Ibuprofen Hydrogel in Wound Healing: An In Vivo Study. *Advances in Materials Science and Engineering*;2022:1–7, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6033815>.
- [34] Movassaghi S, Nadia Sharifi Z, Koosha M, et al. Effect of Honey/PVA Hydrogel Loaded by Erythromycin on Full-Thickness Skin Wound Healing in Rats; Stereological Study. *Galen Med J.*, 2019. doi:10.31661/gmj.v0i0.1362 n.d.
- [35] Balan V, Petrache IA, Popa MI, Butnaru M, Barbu E, Tsibouklis J, Verestiuc L. Biotinylated chitosan-based SPIONs with potential in blood-contacting applications. *J Nanopart Res*;14:730, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0730-y>.
- [36] Ramirez Caballero SS, Saiz E, Montebault A, Tadier S, Maire E, David L, Delair T, Grémillard L. 3-D printing of chitosan-calcium phosphate inks: rheology, interactions and characterization. *J Mater Sci: Mater Med*;30:6, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6201-y>.
- [37] Bercea M. Rheology as a Tool for Fine-Tuning the Properties of Printable Bioinspired Gels. *Molecules*;28:2766, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28062766>.
- [38] Wiegand C, Hipler U-C, Elsner P, Tittelbach J. Keratinocyte and Fibroblast Wound Healing In Vitro Is Repressed by Non-Optimal Conditions but the Reparative Potential Can Be Improved by Water-Filtered Infrared A. *Biomedicines*;9:1802, 2021. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121802>.
- [39] Tripathi S, Mandal SS, Bauri S, Maiti P. 3D bioprinting and its innovative approach for biomedical applications. *MedComm*;4, 2023. <https://doi.org/10.1002/mco2.194>.

Activitate științifică

Articole științifice pe subiectul tezei de doctorat

1. **Nacu I**, Bercea M, Niță L.E, Peptu C.A, Butnaru M, Vereștiuc L, „**3D bioprinted scaffolds based on functionalized gelatin for soft tissue engineering**”, *Reactive and Functional Polymers*, Volume 190, **2023. FI =5.1**
2. Luca A, **Nacu I**, Tănăsache S, Peptu C.A, Butnaru M, Vereștiuc L, „**New Methacrylated Biopolymer-Based Hydrogels as Localized Drug Delivery Systems in Skin Cancer Therapy**”, *Gels*, Volume 9(5), **2023. FI =4.6**
3. Niță L.E, **Nacu I**, Ghilan A, Rusu A.G, Șerban A.M, Bercea M, Vereștiuc L, Chiriac A.C, „**Evaluation of hyaluronic acid-polymacrolactone hydrogels with 3D printing capacity**”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 256, Part 2, **2024. FI =8.2**
4. **Nacu I**, Ghilan A, Rusu A.G, Bercea M, Niță L.E, Vereștiuc L, Chiriac A.C, „**Hydrogels with Antioxidant Microparticles Systems Based on Hyaluronic Acid for Regenerative Wound Healing**”, *Macromolecular Bioscience*, **2024. FI =4.4**
5. Botezatu I, **Nacu I**, Cojocaru F.D, Balan V, Bercea M, Niță L.E, Vereștiuc L, „**3D Printed composite scaffolds based on biopolymers, hydroxyapatite and magnetic nanoparticles for bone tissues defects repair**” – în evaluare

Articole științifice conexe tezei de doctorat

1. Crețu B.E.B, Dodi G, Gardikitios I, Bălan V, **Nacu I**, Stoica I, Stoleru E, Rusu A.G, Ghilan A, Niță L.E, Chiriac A.C, „**Bioactive Composite Cryogels Based on Poly (Vinyl Alcohol) and a Polymacrolactone as Tissue Engineering Scaffolds: In Vitro and In Vivo Studies**”, *Pharmaceutics*, **2023. FI =4.9**
2. Onu I, Gherghel R, **Nacu I**, Cojocaru F.D, Vereștiuc L, Matei D.V, Cașcaval D, Șerban I.L, Jordan A.D, Tucaliuc A, Galaction A, „**Can Combining Hyaluronic Acid and Physiotherapy in Knee Osteoarthritis Improve the Physicochemical Properties of Synovial Fluid?**”, *Biomedicines*, **2024. FI =3.9**
3. Șerban A.M, **Nacu I**, Roșca I, Ghilan A, Rusu A.G, Niță L.E, Niță R.D, Chiriac A.C „**Preparation and Characterization of Polymeric Microparticles Based on Poly(ethylene brassylate-co-squaric Acid) Loaded with Norfloxacin**”, *Pharmaceutics*, **2024. FI =4.9**
4. Platon I.V, Ghiorghita C.A, Lazar M.M, Aprotosoae A.C, Gradinaru A.C, **Nacu I**, Vereștiuc L, Nicolescu A, Ciocarlan N, Dinu V.M, „**Highly Compressible, Superabsorbent, and Biocompatible Hybrid Cryogel Constructs Comprising Functionalized Chitosan and St. John’s Wort Extract**”, *Biomacromolecules*, **2024. FI =5.5**
5. Bibire T, Dănilă R, Yilmaz C.N, Vereștiuc L, **Nacu I**, Ursu R.G, Ghiciuc C.M „**In Vitro Biological Evaluation of an Alginate-Based Hydrogel Loaded with Rifampicin for Wound Care**”, *Pharmaceutics*, **2024. FI =4.6**
6. Afloarea O.T, **Nacu I**, Vereștiuc L, Yilmaz C.N, Panainte A.D, Peptu C.A, Ostafe I.G, Bibire N, „**In Vitro and Ex Vivo Evaluation of Novel Methacrylated Chitosan-PNIPAAm-Hyaluronic Acid Hydrogels Loaded with Progesterone for Applications in Vaginal Delivery**”, *Polymers*, **2024. FI =5**

Prezentări internaționale

1. **International Conference on e-Health and Bioengineering, Iași, 2021: Donea R, Nacu I, Butnaru M, Vereștiuc L, “Methacrylated Collagen/Chitosan Based Hydrogels as Scaffolds for Soft Tissue Engineering”**
2. **International Conference on e-Health and Bioengineering, Iași, 2022: Nacu I, Baiu T, Niță L.E, Vereștiuc L, ”3D Bioprinted Methacrylated Gelatin-Based Scaffolds”, MENȚIUNE**
3. **International Biomedical Science and Technology Symposium, Ankara, Turcia, 2022: Nacu I, Nedelcu L, Niță L.E, Vereștiuc L, “3D Bioprinted hybrid hydrogels based on gelma and functionalised biopolymers for tissue engineering”.**

-
4. **International Conference on Bioengineering and Polymer Science, București, 2023:** Nacu I, Ilie I, Tunaru A, Niță L.E, Verestiuc L, “3D Bioprinted Scaffolds Based on Functionalised Gelatin and Sodium Alginate for Soft Tissue Engineering”.
 5. **NanoBioMat Summer Edition, București, 2023:** Botezatu I, Nacu I, Cojocaru FD, Bălan V, Verestiuc L „3D printed scaffolds based on biopolymers-calcium phosphates and magnetic nanoparticles for bone tissue engineering” – *Best Paper Award*
 6. **MacroYouth, Iași, 2023:** Nacu I, Niță L.E, Verestiuc L, ”*Biocompatible Scaffolds based on Functionalised Polymers For Soft Tissue Engineering*” – *Premiul II*
 7. **NanoBioMat Winter Edition, București, 2023:** Nacu I, Ilie I, Tunaru A, Niță L.E, Verestiuc L, *Biocompatible Hybrid Scaffolds based on Functionalised Gelatin For Soft Tissue Engineering.*
 8. **Conferința Tehnico-științifică a studenților, masteranzilor și doctoranzilor a Universității Tehnice a Moldovei, Chișinău, 2024:** Nacu I, Ilie I, Tunaru A, Niță L.E, Verestiuc, *3D Bioprinted Scaffolds Based on Functionalized Biopolymers for Soft Tissue Engineering.*
 9. **Conferința Tehnico-științifică a studenților, masteranzilor și doctoranzilor a Universității Tehnice a Moldovei, Chișinău, 2024:** Ghiață I, Nacu I, Verestiuc L, *Vascular grafts obtained through 3d printing technologies – Premiul III*
 10. **NanoBioMat Summer Edition, București, 2024:** Nacu I, Ilie I, Tunaru A, Niță L.E, Verestiuc L, **Complex 3D printed architectures for skin tissue repair and regeneration. – Best Presentation Award**

Prezentări internaționale – Secțiunea Poster

1. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, Inc.- European Chapter, 2022 TERMIS-EU Conference, Krakow :** Nacu I, Nedelcu L, Niță L.E, Peptu C.A, Verestiuc L, „3D Bioprinted scaffolds based on functionalised gelatin/chitosan/xanthan, dextran for soft tissue engineering”.
2. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society, Inc.- European Chapter, 2022 TERMIS-EU Conference, Krakow :** Botezatu I, Nacu I, Cojocaru FD, Bălan V, Niță L.E ,Verestiuc L, „3D Printable functionalised gelatin/chitosan, hyaluronic acid, hydroxyapatite and magnetic nanoparticles scaffolds for bone regeneration”.
3. **Appolonia, Iași, 2024:** Nacu I, Ghilan A, Rusu A.G, Serban A.M, Bercea M , Vereștiuc L, Nita L.E, „Hybrid hydrogel systems based on hyaluronic acid and a copolymacro-lactone structure”.

Proiecte de cercetare

1. New hybrid polymer/peptide hydrogels as innovative platforms designed for cell cultures applications” **PN-III-P2-2.1-PED-2019-2743 (2020 - 2022)**
2. „3D bio-inspired hybrid architectures for deep thickness skin repair and regeneration” **PN-III-P2-2.1-PED-2021-3003 (2022 - 2024)**